

Aus der Abteilung für Gastroenterologie

Klinik für Innere Medizin II

Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. H.-G. Lamprecht

Untersuchungen zur Termination der Fibrogenese im Pankreas durch Seneszenz pankreatischer Sternzellen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der

Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von

Michael C. Walther

aus Rostock

urn:nbn:de:gbv:28-diss2015-0091-0

Rostock, August 2014

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Robert Jaster

Einrichtung: Universitätsmedizin Rostock, Klinik für Innere Medizin II, Abt. Gastroenterologie

2. Gutachter: Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Einrichtung: Universitätsmedizin Rostock, Institut für Experimentelle Chirurgie

3. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Saleh Ibrahim

Einrichtung: Universität Lübeck, Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie

Tag der Einreichung: 22.08.2014

Tag der Verteidigung: 02.06.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iv
1 Einleitung.....	1
1.1 Chronische Pankreatitis.....	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Epidemiologie	1
1.1.3 Einteilung und Ätiologie	1
1.1.4 Pathogenese	3
1.1.5 Klinik und Diagnostik	4
1.1.6 Therapie.....	5
1.2 Pankreatische Sternzellen und Fibrose	6
1.2.1 PSZ <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	6
1.2.2 Mechanismen der PSZ-Aktivierung	7
1.3 Seneszenz	9
1.3.1 Was ist zelluläre Seneszenz?	9
1.3.2 Auslösemechanismen der Seneszenz.....	10
1.3.3 Signalwege der Seneszenz.....	11
1.3.4 Detektion seneszenten Zellen.....	11
1.3.5 Seneszenz von Sternzellen	12
1.4 Das Dibutylzinndichlorid-Pankreatitismodell.....	13
1.4.1 Allgemeines	13
1.4.2 Histologische Betrachtungen	14
1.4.3 Immunologische Betrachtungen	14
1.4.4 Vergleichbarkeit zur humanen chronischen Pankreatitis	14
1.5 Zielstellung.....	15
2 Material.....	16
2.1 Allgemeines Labormaterial.....	16
2.2 Geräte.....	16
2.3 Zellkultur.....	16

2.3.1	Reagenzien und Lösungen für die Kultivierung.....	16
2.3.2	Antikörper und Lösungen für die α -SMA-Immunfluoreszenz	17
2.3.3	Reagenzien und Lösungen für die SA- β -Gal-Färbung.....	18
2.4	Gewebefärbungen.....	18
2.4.1	Antikörper und Lösungen für die APAAP-Färbung	18
2.4.2	Reagenzien und Lösungen für die SA- β -Gal-Färbung.....	20
3	Methoden	21
3.1	Zellkultur.....	21
3.1.1	Verwendete Zellen	21
3.1.2	Kultivierung und Passagierung	21
3.1.3	α -SMA-Immunfluoreszenz.....	22
3.1.4	Seneszenz-assoziierte- β -Galactosidase-Färbung	22
3.2	Rattenmodell der DBTC-Pankreatitis	23
3.3	DBTC-Pankreatitis und Depletion von NK-Zellen	24
3.4	Gewebefärbungen.....	24
3.4.1	HE-Färbung	25
3.4.2	Immunhistochemie - APAAP-Färbung.....	25
3.4.2.1	Präparatherstellung	25
3.4.2.2	Färbemethode.....	26
3.4.2.3	Auswertung.....	28
3.4.3	Seneszenz-assoziierte- β -Galactosidase-Färbung	28
3.4.3.1	Färbemethode.....	28
3.4.3.2	Auswertung.....	28
3.5	Statistik	29
4	Ergebnisse.....	30
4.1	Zellkultur.....	30
4.2	DBTC-Pankreatitis.....	33
4.2.1	Allgemeines	33
4.2.2	HE-Färbung	35
4.2.2.1	Entzündung	35
4.2.2.2	Fibrose.....	36
4.2.3	SA- β -Gal-Färbung (Seneszente Zellen)	38

4.2.4	Immunhistochemie.....	40
4.2.4.1	Markerproteine für Pankreatische Sternzellen	40
4.2.4.2	Ki67 (Proliferierende Zellen)	44
4.2.4.3	CD161 (Natürliche Killerzellen)	46
4.2.4.4	CD4 (T-Helferzellen)	48
4.2.4.5	CD8a (Zytotoxische T-Zellen)	50
4.2.4.6	HIS36 (Makrophagen)	52
4.2.4.7	RK-4 (Granulozyten)	54
4.2.5	Kolokalisation	56
4.3	NK-Zelldepletion bei DBTC-Pankreatitis	57
5	Diskussion	61
5.1	Aktivierung und Seneszenz von PSZ in Zellkultur	61
5.2	Seneszenz im Kontext der DBTC-Pankreatitis	63
5.2.1	Entzündung und Fibrose.....	64
5.2.2	Seneszenz	65
5.2.3	PSZ und Aktivierung.....	65
5.2.4	Proliferierende Zellen	66
5.2.5	Zellen des Immunsystems	67
5.2.6	Histopathologische Veränderungen im Verlauf der DBTC-Pankreatitis	68
5.3	DBTC-Pankreatitis und die Rolle von NK-Zellen	69
5.4	Integrative Betrachtung	70
6	Zusammenfassung	72
7	Thesen	75
8	Literaturverzeichnis.....	77
9	Anhang	I
9.1	Herstellerverzeichnis	I
9.2	Danksagung	II
9.3	Veröffentlichungen.....	III

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	akute Pankreatitis
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD95L	CD95 Ligand
CDKI	<i>Cycline-dependent kinase inhibitor</i>
CH	Schweiz
CP	chronische Pankreatitis
CT	Computertomographie
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
D	Deutschland
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBTC	<i>Dibutyltin Dichloride</i> (Dibutylzinndichlorid)
DMF	N-N-dimethylformamide
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ERCP	endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
ET-1	Endothelin-1
EUS	endoskopischer Ultraschall
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum

Abkürzungsverzeichnis

FNAB	Feinnadelaspirationsbiopsie
G1/2-Phase	Kontrollphase vor und nach der S-Phase (G für engl. <i>gap</i>)
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin/Eosin
HSZ	Hepatische Sternzellen
i. v.	intravenös
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
M-Phase	Mitosephase
MRCP	Magnetresonanzcholangiopankreatikographie
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NEA	nicht-essentielle Aminosäuren
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSAID	<i>nonsteroidal antiinflammatory drugs</i>
P(1/2/3...)	Passage (1/2/3...)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
pRb	Retinoblastomprotein
PSZ	pankreatische Sternzellen
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SAHF	Seneszenz-assoziierte Heterochromatin-Foci
SA-β-Gal	Seneszenz-assoziierte β-Galactosidase

SEM	<i>standard error of the mean</i>
S-Phase	Synthesephase
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TGF- α	<i>transforming growth factor α</i>
TGF- β 1	<i>transforming growth factor β1</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor α</i>
TRAIL	<i>tumor necrosis factor-α-related apoptosis-inducing ligand</i>
V-RAS	virales RAS
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β D-galactopyranoside powder
ZAP	Zentralapotheke des Klinikums
α -SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>

1 Einleitung

1.1 Chronische Pankreatitis

1.1.1 Definition

Die chronische Pankreatitis (CP) ist eine fortschreitende, destruierende und entzündliche Erkrankung der Bauchspeicheldrüse, welche mit morphologischen und histologischen Veränderungen einhergeht. Diese verursachen typischerweise Schmerzen und/oder einen fortschreitenden Funktionsverlust [Etemad, Whitcomb, 2001].

1.1.2 Epidemiologie

Die CP ist eine seltene Erkrankung. Die Inzidenz beträgt circa 6 - 8 pro 100 000 und Jahr [Díte *et al.*, 2001; Lankisch *et al.*, 2002]. Die Dunkelziffer ist sicher höher, da die Diagnostik besonders in den Anfangsstadien schwierig ist. Die Lüneburger Studie von Lankisch *et al.* (2002) zeigte, dass mehr als 75 % der Betroffenen Männer waren. Der Erkrankungsgipfel war im Alter zwischen 45 und 54 Jahren, circa 10 Jahre nach dem Peak der akuten Pankreatitis, zu finden [Lankisch *et al.*, 2002]. Die 10-Jahres-Überlebensrate beträgt 70 % und die 20-Jahres-Überlebensrate 45 %. Verglichen mit Patienten ohne Pankreatitis ist die Mortalitätsrate um den Faktor 3,6 erhöht [Lankisch, 2001].

1.1.3 Einteilung und Ätiologie

Im Laufe der letzten 50 Jahre wurden verschiedene Einteilungen der chronischen Pankreatitis entwickelt. Die Bedeutungsvollsten sind die Klassifikation von Marseille von 1963, deren Überarbeitungen 1984 und 1988 (Klassifikation von Marseille-Rom) sowie die Klassifikation von Cambridge 1984 [Etemad, Whitcomb, 2001].

Im Jahr 2001 wurde das TIGAR-O-Klassifikationssystem veröffentlicht. Es wurde nach den möglichen Risikofaktoren der chronischen Pankreatitiden entwickelt und ist heute die wichtigste Art der Einteilung [Etemad, Whitcomb, 2001]. In Tabelle 1.1 ist die TIGAR-O-Klassifikation dargestellt.

Toxisch-Metabolisch (T):
<ul style="list-style-type: none"> - Alkohol - Tabak - Hyperkalzämie (Hyperparathyreoidismus) - Hyperlipidämie (umstritten) - Chronisches Nierenversagen - Medikamente - Toxine
Idiopathisch (I):
<ul style="list-style-type: none"> - Früher Beginn - Später Beginn - Tropisch - Andere
Genetisch (G):
<ul style="list-style-type: none"> - Autosomal-dominant (Mutation im Kationischen Trypsinogen-Kodon 29 und 122) - Autosomal-rezessiv (CFTR-Mutation, SPINK1-Mutation, Mutation im Kationischen Trypsinogen-Kodon 16, 22, 23, möglicherweise auch α1-Antitrypsinmangel)
Autoimmun (A):
<ul style="list-style-type: none"> - Lymphoplasmozytisch-sklerosierende Pankreatitis (Typ 1) - Ideopathische gangbezogene Pankreatitis (Typ 2) [Sah <i>et al.</i>, 2010; Jaster <i>et al.</i>, 2012]
Rezidivierende und schwere akute Pankreatitis (R):
<ul style="list-style-type: none"> - Postnekrotisch (schwere akute Pankreatitis) - Rezidivierende akute Pankreatitis - Gefäßerkrankungen/Ischämie - Pankreatitis nach Bestrahlung
Obstruktiv (O):
<ul style="list-style-type: none"> - Pankreas divisum - Dysfunktion des Sphinkter Oddi (umstritten) - Gangobstruktion (z.B. Tumor) - Präampulläre Duodenalwandzysten - Posttraumatische Pankreasgangnarben

Tab. 1.1: TIGAR-O-Klassifikationssystem zur Einteilung chronischer Pankreatitiden nach der Ätiologie [modifiziert nach Etemad und Whitcomb, 2001]

Alkohol ist der wichtigste einzelne Risikofaktor für eine chronische Pankreatitis. Etwa 70 % aller erwachsenen Erkrankten nehmen häufig und langfristig Alkohol zu sich. Die Meisten tranken täglich mehr als 150 g Alkohol über einen Zeitraum von 6 bis 12 Jahren [Nair *et al.*, 2007]. Jedoch ist Alkohol nicht als alleiniger Risikofaktor in der Lage, eine CP zu induzieren. Dieser Vorgang ist abhängig von weiteren, noch nicht vollständig geklärten genetischen oder umweltassoziierten Faktoren. Dies zeigt die vergleichsweise geringe Prävalenz

der CP von nur etwa 10 % unter starken Trinkern [Etemad, Whitcomb, 2001; Stevens *et al.*, 2004]. Das Rauchen von Tabak ist ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer CP. Das Risiko steigt mit der Menge des Konsums [Etemad, Whitcomb, 2001].

Die idiopathische CP tritt in etwa 10-30 % der Fälle auf und setzt sich hauptsächlich aus der tropischen Form, der *Early-onset*-Pankreatitis und der *Late-onset*-Pankreatitis zusammen [Etemad, Whitcomb, 2001; Stevens *et al.*, 2004].

Etwa in 25 % der CPs konnten bisher genetische Risikofaktoren nachgewiesen werden. Dazu zählen Mutationen im *PRSS1*- (Kationisches Trypsinogen), *CFTR*- (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) und *SPINK1*-Gen (Serin Protease Inhibitor vom Typ Kazal 1). Eine autosomal-dominante Vererbung besteht, wenn Codon 29 oder 122 des *PRSS1*-Gens betroffen ist. Diese CP beginnt meist im Kindesalter [Rieman *et al.*, 2010] und hat eine Penetranz von ca. 80 % [Schneider, Whitcomb, 2002]. Der Vererbungsmodus des *SPINK1*- und *CFTR*-Gens sowie anderer Codone des *PRSS1*-Gens ist noch nicht vollständig aufgeklärt, man geht jedoch von rezessiver Vererbung aus. Außerdem sind diese Genmutationen ebenfalls bei alkoholischen und idiopathischen CPs gehäuft zu finden [Rieman *et al.*, 2010].

In 5-6 % der Fälle treten Autoimmunpankreatitiden auf [Nair *et al.*, 2007]. Diese werden heute in Typ 1 (Lymphoplasmozytisch-sklerosierende Pankreatitis) und Typ 2 (Idiopathische gangbezogene Pankreatitis) eingeteilt. Die Unterscheidung von anderen Pankreatitiden ist essentiell, da die Autoimmun-CP mit Steroiden gut behandelt werden kann [Sah *et al.*, 2010; Jaster *et al.*, 2012].

Weiterhin kommen Obstruktionen des Gangsystems sowie rezidivierende und schwere akute Pankreatitiden als Ursachen einer CP in Frage [Etemad, Whitcomb, 2001].

1.1.4 Pathogenese

Die pathogenetischen Mechanismen der CP sind noch nicht vollständig erforscht. Die verschiedenen ursächlichen Faktoren der Erkrankung legen unterschiedliche Pathomechanismen nahe, welche zur chronischen Pankreatitis führen [Stevens *et al.*, 2004]. Histologisch fällt das Pankreas durch Entzündung, Azinusatrophie, Gangveränderungen und Fibrose auf [Nair *et al.*, 2007].

Zur Erklärung der Pathogenese wurden bisher vier wichtige Theorien entwickelt. Braganza beschrieb in seiner Detoxifikationstheorie, dass die abnorme Funktion hepatischer MFOs (*mixed function oxidases*) zur Erkrankung des Pankreas führt. Unterschiedliche Faktoren wie

Medikamente, Rauchen, Alkohol oder Kaffee induzieren die Enzyme und der Verzehr von mehrfach ungesättigten Fettsäuren unterstützt die Empfindlichkeit für die Induktion. Die Reaktionsprodukte der Detoxifikation durch die MFOs (Lipidperoxide, toxische Epoxide, Karzinogene, freie Radikale) finden sich in höherer Konzentration im Gallensekret und führen durch Reflux in den Pankreasgang zu den pathologischen Veränderungen der chronischen Pankreatitis [Braganza, 1983].

Die toxisch-metabolische Theorie stammt von Bordalo. Alkohol sorgt für Lipideinlagerungen in den Azinuszellen. Diese fettige Degeneration führt zu Zellnekrosen, gefolgt von einer fibrotischen Reaktion des Pankreas [Stevens *et al.*, 2004].

Die Obstruktionstheorie von Sarles beschreibt die Entstehung von Proteinplaques und Steinen. Voraussetzung dafür ist der Einfluss von Alkohol, welcher die Gesamtprotein-konzentration und damit die Viskosität des Pankreassekrets erhöht und verschiedene andere Parameter (z.B. Bikarbonat, pH, sekretorische Trypsininhibitorkonzentration) senkt [Sarles *et al.*, 1989]. Auf diese Weise steigt die Lithogenität stark an. Die Steine führen zu Verletzungen und Vernarbungen des Pankreasganges, was eine Obstruktion sowie die Stase des Pankreassekretes zur Folge hat. Letztere begünstigt weitere Steinbildungen und sorgt wahrscheinlich auch für Zellatrophie und Fibrose [Stevens *et al.*, 2004].

Im Gegensatz dazu führen nach der Nekrose-Fibrose-Theorie rezidivierende akute Pankreatitiden zur CP. Im Rahmen der akuten Pankreatitiden kommt es zu Hämorrhagien und interstitiellen Fettgewebnekrosen. Die Folge ist wahrscheinlich eine perilobuläre Fibrose, welche zur Deformation von interlobulären Pankreasgängen mit Entstehung von Aussackungen und Strikturen führt. Dadurch wird der Abfluss des Pankreassekrets behindert und es kommt vermehrt zur Ausfällung von Proteinen mit anschließender Kalzifizierung. Als Folge dieser Obstruktion treten Zellatrophien und weitere Pankreasfibrosierung auf [Klöppel, Maillet, 1993; Stevens *et al.*, 2004].

1.1.5 Klinik und Diagnostik

Die Leitsymptome der CP sind pankreatische Schmerzen sowie eine exokrine und endokrine Insuffizienz der Bauchspeicheldrüse. Starke Schmerzen treten im Bereich des Ober- bzw. Mittelbauches auf und strahlen oftmals gürtelförmig in den Rücken aus. Etwa 6-20 % der CPs können allerdings schmerzfrei verlaufen. Steatorrhoe, Gewichtsverlust und erhöhte Infek-

tionsempfindlichkeit sind Folgen der exokrinen Pankreasinsuffizienz, während die endokrine Insuffizienz zu Diabetes mellitus führen kann [Lankisch, 2001].

Als Komplikationen der CP können Pseudozysten, Abszesse, Gallengangs-, Duodenal- und Kolonstenosen, Pleuraergüsse, Aszites und gastrointestinale Blutungen auftreten. Das Risiko für Pankreaskarzinome sowie extrapankreatische Karzinome ist erhöht [Lankisch, 2001].

Bei Verdacht auf CP sind verschiedene Labortests indiziert. Dazu gehört die Bestimmung der Amylase, Lipase, Bilirubin, alkalischen Phosphatase, Lebertransaminasen, Kalzium, Lipide, verschiedener Autoimmunantikörper sowie des Nüchternblutzuckers im Serum. Außerdem ist ggf. ein Pankreasfunktionstest, wie z.B. der Elastasetest im Stuhl, sinnvoll [Nair *et al.*, 2007].

Zur weiteren Abklärung der Diagnose ist das Kontrastmittel-CT (Computertomographie) Mittel der ersten Wahl. Pathognomonisch können Kalzifikationen im Pankreasgang erkennbar sein. Pseudozysten, Gangdilatation, Thrombosen, Pseudoaneurysmen, Nekrosen und Parenchymatrophien sind außerdem mit dem CT nachweisbar. Mit Hilfe der MRCP (Magnetresonanzcholangiopankreatikographie) oder des EUS (Endoskopischer Ultraschall) ist die Anatomie des Pankreasgangs darstellbar, was zum Nachweis von Steinen, Strikturen und Pseudozysten dienen kann. Die ERCP (endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie) wird von diesen beiden Untersuchungsmethoden wegen ihrer höheren Komplikationsraten zurückgedrängt. Zur Diagnostik einer frühen CP ist der EUS mit Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB) am besten geeignet. Weiterhin sind auf diese Art und Weise zystische und parenchymatöse Läsionen untersuchbar. Auch ein Pankreaskarzinom kann am ehesten mittels EUS und FNAB diagnostiziert werden [Nair *et al.*, 2007].

1.1.6 Therapie

Da die Pathogenese der CP noch nicht ausreichend aufgeklärt ist, gibt es bisher noch keine kausalen Therapien. Symptomatisch kommen medikamentöse (konservative), endoskopische und chirurgische Optionen für die Behandlung der CP in Betracht [Nair *et al.*, 2007]. Wichtig für die konservative Therapie sind die Alkohol- und Tabakabstinenz sowie das Essen vieler kleiner fettarmer Mahlzeiten. Mit Hilfe von NSAIDs (*Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs*), Paracetamol und Betäubungsmitteln können die Schmerzen behandelt werden. Pankreasenzyme beseitigen eine Steatorrhoe und sorgen dafür, dass die Nahrung gut verdaut und absorbiert werden kann. Zur Behandlung der endokrinen Pankreasinsuffizienz wird

Insulin eingesetzt. Sollte eine Autoimmun-CP vorliegen, sind Steroide das Mittel der Wahl [Nair *et al.*, 2007, Jaster *et al.*, 2012].

Die endoskopische Therapie kann in Form einer ERCP stattfinden. Symptomatische Zysten können drainiert werden. Steine sind mittels Papillotomie und extrakorporaler Stoßwellenlithotripsie entfernbar. Strikturen können gelöst und mittels Stent offen gehalten werden. In der Regel bringen diese Behandlungen auch eine Besserung der Schmerzen mit sich [Nair *et al.*, 2007].

Zu den chirurgischen Maßnahmen zählen die laterale Pankreatikojejunostomie, die Pankreatoduodenektomie (Whipple-Operation), die pyloruserhaltende Pankreatoduodenektomie und die totale Pankreatektomie. Die Indikationen für chirurgische Eingriffe sind Obstruktionen der umgebenden anatomischen Strukturen, Hämorrhagien, pankreatische Schmerzen sowie der Verdacht auf Neoplasien [Nair *et al.*, 2007]. Zwei Studien zeigten, dass die chirurgische Intervention in Bezug auf die Langzeitkontrolle der Schmerzen bei Obstruktion des Pankreasganges der endoskopischen Behandlung überlegen ist [Díte *et al.*, 2003; Cahen *et al.*, 2007].

1.2 Pankreatische Sternzellen und Fibrose

Die CP geht, genau wie auch das Pankreaskarzinom, mit einer progressiven Fibrose einher. Diese wird sowohl bei der menschlichen Erkrankung als auch bei der CP von Ratten hauptsächlich durch sogenannte aktivierte pankreatische Sternzellen (PSZ) verursacht [Haber *et al.*, 1999; Jaster, Emmrich, 2008]. Bestandteile der fibrotischen Ablagerungen sind interstitiell die Kollagene I und III sowie Prokollagen III. Weitgehend auf die Basallamina begrenzt sind Kollagen IV und Laminin. Fibronektin befindet sich sowohl interstitiell als auch in der Basallamina [Kennedy *et al.*, 1987].

1.2.1 PSZ *in vitro* und *in vivo*

Im gesunden Pankreas machen ruhende, also nicht aktivierte PSZ etwa 4 % aller Zellen aus [Apte *et al.*, 1998]. Sie befinden sich in den interlobulären und interazinären Bereichen [Bachem *et al.*, 1998]. Die Zellen sind im ruhenden Stadium *in situ* rundlich und umringen mit ihren langen Zellfortsätzen sternförmig die benachbarten Azinuszellen. In Kultur erscheinen isolierte PSZ nach 24 Stunden sternförmig, flach und kantig. In diesem noch ruhenden Stadium sind sie positiv für die Marker Desmin und GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) und

negativ für α -SMA (α -smooth muscle actin). Außerdem haben sie, genau wie HSZ (hepatische Sternzellen) [de Leeuw *et al.*, 1984], charakteristische Fetttröpfchen im Zytoplasma, welche Vitamin A beinhalten [Apte *et al.*, 1998]. Ruhende PSZ sind außerdem in ihrer Proliferation und der Synthese von Extrazellulärmatrix (EZM) eingeschränkt [Jaster, Emmrich, 2008]. Nach 48 Stunden Kulturdauer sind die PSZ bereits positiv für α -SMA und die Vitamin A-haltigen Fetttröpfchen sind rückläufig. Die Zellen proliferieren stark und bilden große Mengen EZM. Diese Kennzeichen weisen auf den Aktivierungs- und Umwandlungsprozess dieser Zellen zu Myofibroblasten-ähnlichen Zellen hin, den auch HSZ während der Leberfibrose durchlaufen [de Leeuw *et al.*, 1984; Ballardini *et al.*, 1988; Apte *et al.*, 1998; Bachem *et al.*, 1998; Jaster, Emmrich, 2008]. Die Arbeitsgruppe um Haber zeigte im Gewebe der CP von humanem Pankreas sowie von Rattenpankreas, dass eine starke Kolo-kalisation von Fibrose mit aktivierten PSZ, nachgewiesen durch die α -SMA-Färbung, vorhanden war. Außerdem war Prokollagen $\alpha 1$ (I) streng auf spindelförmige Zellen beschränkt, die in den meisten Fällen ebenfalls α -SMA-positiv waren und sich in fibrotischen Bereichen befanden. Diese Entdeckungen legen PSZ als Hauptproduzenten der EZM auch *in vivo* nahe [Haber *et al.*, 1999].

1.2.2 Mechanismen der PSZ-Aktivierung

Die Aktivierung von PSZ und die damit verbundene Initiation der Fibrose im Pankreas kann nach heutigem Wissensstand auf unterschiedliche Faktoren zurückgeführt werden. Voraussetzung der Sternzellaktivierung ist die Schädigung des Pankreas, z.B. durch Toxine wie Alkohol und seine Metaboliten (z.B. Acetaldehyd) [Apte *et al.*, 2000]. Oxidativer Stress [Apte *et al.*, 2000] sowie Zytokine und Wachstumsfaktoren [Bachem *et al.*, 1998; Apte *et al.*, 1999] führen dann zur PSZ-Aktivierung. *Transforming growth factor* $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) ist der stärkste bekannte Stimulator der EZM-Synthese [Sparmann *et al.*, 1997; Bachem *et al.*, 1998] und kann in mononukleären Zellen (vermutlich Entzündungszellen und PSZ) [van Laethem *et al.*, 1995], in Zellen der Ausführungsgänge [van Laethem *et al.*, 1995; Slater *et al.*, 1995] sowie in Azinuszellen (wobei die Arbeitsgruppe Haber *et al.* nur TGF- β nachwies) [Slater *et al.*, 1995; Haber *et al.*, 1999] gebildet werden. Weitere Stimulatoren der EZM-Synthese sind *platelet derived growth factor* (PDGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF) sowie *transforming growth factor* α (TGF- α) [Bachem *et al.*, 1998]. PDGF führt *in vitro* zur Proliferationssteigerung von PSZ und wird während einer Pankreatitis vermutlich von Makrophagen und Thrombozyten ausgeschüttet [Apte *et al.*, 1999]. Außerdem spielen

bei der Aktivierung von PSZ auch die Interleukine (IL) 1, 6 und 10, *tumor necrosis factor α* (TNF- α) sowie das Renin-Angiotensin-System eine Rolle (Mews *et al.*, 2002; Reinehr *et al.*, 2004; Jaster, Emmrich, 2008; Erkan *et al.*, 2012].

Über autokrine *Loops* sind PSZ vermutlich außerdem in der Lage, selbstständig den aktivierten Phänotyp aufrecht zu erhalten. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum über den Stopp des pathogenetischen Stimulus (beispielsweise Alkoholkonsum) hinaus der Krankheitsprozess der CP des Menschen oft weiter voranschreitet. Zytokine mit autokriner Wirkung sind u. a. TGF- β 1, Activin A, *connective tissue growth factor* (CTGF) und Endothelin-1 (ET-1) [Jaster,Emmrich, 2008]. Abbildung 1.1 zeigt eine Übersicht der sternzell-aktivierenden Faktoren.

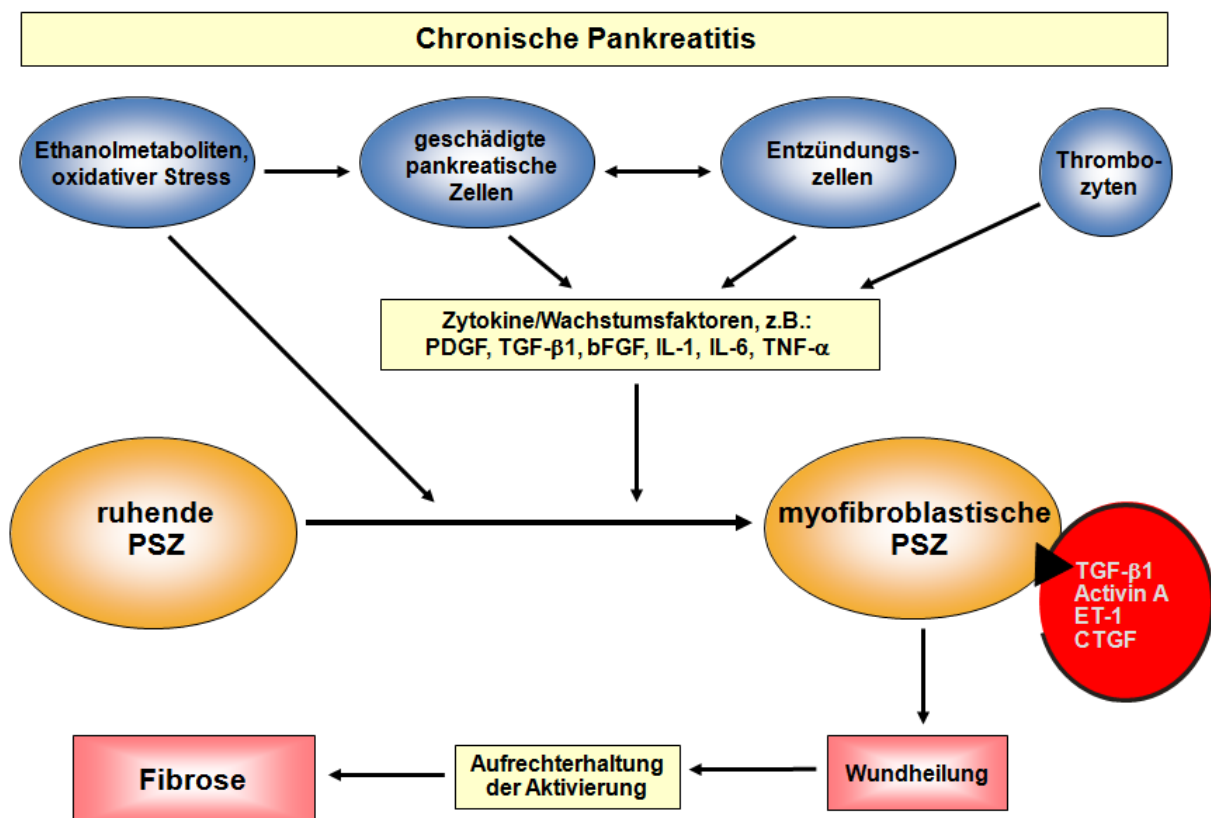


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung von auf PSZ aktivierend wirkenden Zytokinen und autokrinen Loops.

bFGF = basic fibroblast growth factor, CTGF = connective tissue growth factor, ET-1 = Endothelin-1, IL-1 = Interleukin 1, IL-6 = Interleukin 6, PDGF = platelet derived growth factor, PSZ = pankreatische Sternzellen, TGF- α = transforming growth factor α , TGF- β 1 = transforming growth factor β 1; Modifiziert nach Jaster R., Mol Cancer, 2004 (Erklärung siehe Text)

1.3 Seneszenz

Die Ablagerung von EZM im Rahmen einer Pankreatitis ist Teil der Regeneration des Organs nach Schädigung des Gewebes. In diesem Lichte gesehen, ist nicht die EZM-Ablagerung an sich, sondern die fehlende Beendigung dieses Prozesses pathologisch [Jaster, Emmrich, 2008; Fitzner *et al.*, 2012]. Die Arbeitsgruppe um Krizhanovsky zeigte, dass die Seneszenz von HSZ die Leberfibrose begrenzt [Krizhanovsky *et al.*, 2008]. Auf der Grundlage vieler wichtiger Parallelen zwischen PSZ und HSZ stellte sich die Frage, ob die Seneszenz auch einen Mechanismus zur Termination für die Fibrose des Pankreas darstellen könnte.

Bereits in den 60er Jahren wurde bekannt, dass sich Zellen *in vitro* nur begrenzt teilen können. So zeigte Hayflick, dass diploide Zellen von humanen Feten nach ca. 50 Teilungen in ihrer Proliferation abnahmen und diskutierte einen Zusammenhang mit zellulärer Seneszenz [Hayflick, 1965].

Die zelluläre Seneszenz dient dem Ziel, eine maligne Entartung von Zellen durch den Proliferationsstopp zu verhindern [Serrano *et al.*, 1997]. Experimente an genmanipulierten Mäusen zeigten, dass die gesteigerte Expression von p53 vermutlich durch Seneszenz zur weitgehenden Tumorfreiheit führte, gleichzeitig aber viele Alterungsprozesse schneller vorantrieb [Tyner *et al.*, 2002]. Diesen zweiseitigen Effekt nennt man antagonistische Pleiotropie [Williams, 1957; Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007]. Die oben genannte Arbeit von Krizhanovsky [Krizhanovsky *et al.*, 2008] legt nahe, dass die zelluläre Seneszenz darüber hinaus auch entscheidende Bedeutung für den Verlauf von weiteren nicht malignen Erkrankungen haben könnte.

1.3.1 Was ist zelluläre Seneszenz?

Der Begriff Seneszenz ist ein Synonym für das Altern. Morphologisch sind seneszente, also gealterte Zellen durch Abflachung und Vergrößerung der Zellkörper charakterisiert. Das wichtigste Kriterium zellulärer Seneszenz ist der irreversible Wachstumsarrest in der G1-Phase des Zellzyklus [Di Leonardo *et al.*, 1994; Serrano *et al.*, 1997]. Trotz adäquater Wachstumsbedingungen können die Zellen nicht in die S-Phase des Zellzyklus eintreten [Stein, Dulić, 1995]. Weiterhin bilden seneszente Zellen einen sogenannten Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp aus. Dieser beinhaltet eine Veränderung in der Expression von vielen verschiedenen Genen. Wichtige Beispiele sind die Hochregulation von Zellzyklusinhibitoren wie p21 oder p16, die Hemmung der Synthese proliferationsfördernder

Proteine sowie eine vermehrte Expression von Sekretionsproteinen, welche die Mikroumgebung verändern und inflammatorische Prozesse steuern. Einige Zellarten bilden außerdem auch Resistenzen gegen einige apoptosefördernden Signale aus [Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007].

1.3.2 Auslösemechanismen der Seneszenz

Es sind verschiedene Auslöser der Seneszenz bekannt [Ben-Porath, Weinberg, 2005; Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007]. So kommt es während jeder Zellteilung zu einer Verkürzung der Chromosomenenden, den Telomeren [Harley *et al.*, 1990]. Bereits die kritische Verkürzung von Telomeren weniger Chromosomen führt zur Dysfunktion der DNS und löst anschließend die replikative Seneszenz aus. Die Zelle wird proliferationsunfähig [Martens *et al.*, 2000; Hemann *et al.*, 2001].

Auch viele Onkogene führen zur Seneszenz und damit zum Zellzyklusarrest [Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007]. Ein Beispiel ist das Onkogen *RAS*, welches ohne Kombination mit weiteren Onkogenen oder dem Ausfall von Tumorsuppressoren wie p53 oder p16 in Primärzellen keine Proliferation, sondern stattdessen Seneszenz bewirkt [Newbold, Overell, 1983; Serrano *et al.*, 1997].

Ein weiterer Auslöser von zellulärer Seneszenz sind DNS-Schäden, insbesondere Strangbrüche der DNS. Diese entstehen z.B. durch Strahlung oder verschiedene Chemotherapeutika [Nelson, Kastan, 1994; Di Leonardo *et al.*, 1994; Parrinello *et al.*, 2003]. Bereits ein oder wenige DNS-Brüche sind vermutlich für die Induktion von Seneszenz ausreichend [Di Leonardo *et al.*, 1994].

Die Hemmung von Histondeacetylasen fördert die Bildung von aktivem Euchromatin und induziert Seneszenz [Ogryzko *et al.*, 1996; Munro *et al.*, 2004; Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007]. Paradox scheint, dass auch ein niedriger Spiegel an Histonacetyltransferasen, welcher die Heterochromatinbildung steigert, zu Seneszenz führen kann [Bandyopadhyay *et al.*, 2002; Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007].

Einige bekannte Stressoren können bei ihrem Einwirken auf Zellen ebenfalls zu vorzeitiger Seneszenz führen [Ben-Porath, Weinberg, 2005; Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007]. So kann z.B. oxydativer Stress, vermittelt durch erhöhte Sauerstoffkonzentrationen [Packer, Fuehr, 1977; Chen *et al.*, 1995], Behandlung von Zellen mit Wasserstoffperoxid [Fitzner *et al.*, 2012] oder die Ausschaltung der Superoxiddismutase [Blander *et al.*, 2003] den Proliferationsstopp

auslösen. Weiterhin können veränderte, inadäquate Wachstumsbedingungen in Zellkulturen eine verfrühte Seneszenz induzieren [Ramirez *et al.*, 2001]. Auch die chronische Wirkung von Zytokinen wie Interferon- β (IFN- β) [Moiseeva *et al.*, 2006] oder TGF- β 1 [Tremain *et al.*, 2000] auf Zellen kann diese in das Stadium der Seneszenz überführen. Die Arbeitsgruppe um Tremain zeigte an Epithelzellen von Mäusen, dass die Induktion von Seneszenz durch das Onkogen *V-RAS* von einer starken TGF- β 1 Sekretion begleitet wird. Nach gentechnischer bzw. immunologischer Ausschaltung von TGF- β 1 war die Induktion der Seneszenz stark vermindert [Tremain *et al.*, 2000].

1.3.3 Signalwege der Seneszenz

Die zentralen Vermittler zellulärer Seneszenz sind die Tumorsuppressoren p53 und Retinoblastomproteine (pRb). Sie sind in jeweils eigene Signalwege involviert, welche miteinander interagieren, aber je nach Art der Zelle und des Organismus auch unabhängig voneinander Seneszenz etablieren und aufrechterhalten können [Serrano *et al.*, 1997; Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007]. Der *Cycline-dependent kinase inhibitor* (CDKI) p16 hemmt die *Cycline-dependent kinases* (CDK) 4 und 6, welche dadurch pRb nicht mehr phosphorylieren können [Guan *et al.*, 1994; Lukas *et al.*, 1995]. Die Hypophosphorylierung von pRb blockiert dann die Freigabe von E2F-Transkriptionsfaktoren. Dadurch werden der durch E2F vermittelte Start der Transkription wichtiger Proliferations-assoziiierter Gene und der Zellzyklus am Übergang G1/S behindert. Außerdem kann hypophosphoryliertes pRb auch die Bildung sogenannter Seneszenz-assoziiierter Heterochromatin-Foci (SAHF) auslösen, welche dann über die dauerhafte Blockierung wichtiger Proliferationsgene die Seneszenz aufrecht erhalten [Narita *et al.*, 2003; Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007]. Das Protein p53 induziert den Wachstumsarrest teilweise über die gesteigerte Expression von p21 [El-Deiry *et al.*, 1993; Slebos *et al.*, 1994]. Dieses Protein ist ein CDKI und hemmt z.B. CDK2 und CDK4, welche nun ebenfalls pRb nicht mehr phosphorylieren können. Auch dieser Mechanismus blockiert so die Transkription wichtiger Proliferationsgene und stellt so eine zentrale Verbindung beider Signalwege dar [Harper *et al.*, 1993; Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007].

1.3.4 Detektion seneszenten Zellen

Um seneszente Zellen zu erkennen, nutzt man verschiedene Marker und Eigenschaften. Keines dieser Charakteristika ist dabei spezifisch nur für seneszente Zellen. Der derzeitige

Goldstandard zum Nachweis seneszenten Zellen ist die Färbung dieser Zellen über den Nachweis Seneszenz-assoziiierter β -Galactosidase (SA- β -Gal). Diese Färbung ist in der Lage, ruhende Fibroblasten, vollständig ausdifferenzierte Keratinozyten, präseneszenten, sowie immortalisierte Zellen von solchen im Seneszenzstadium zu unterscheiden. Sie kann sowohl an einzelnen Zellen als auch im Gewebe genutzt werden [Dimri *et al.*, 1995; Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007]. Aber auch andere Eigenschaften wie der Proliferationsstopp in der G1-Phase, die Zellmorphologie und ein verändertes Genexpressionsprofil können trotz deutlich geringerer Spezifität mit zur Identifikation seneszenten Zellen herangezogen werden [Serrano *et al.*, 1997; Zhang, Cohen, 2004]. Darüber hinaus gibt es noch verschiedene weitere Seneszenzmarker wie das Protein p16 [Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007] oder charakteristische Veränderungen der DNS. Zu letzteren gehören die SAHF [Narita *et al.*, 2003] und DNS-Schäden, welche mit einer erhöhten Phosphorylierungsrate von Histon H2AX und einer vermehrten Expression des p53-Bindungsprotein-1 einhergehen [d'Adda di Fagagna *et al.*, 2003; Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007].

1.3.5 Seneszenz von Sternzellen

Aufgrund ihres Pioniercharakters auf dem Gebiet der Sternzellseneszenz soll an dieser Stelle die Arbeit von Krizhanovsky *et al.* (2008) näher beleuchtet werden. Die Arbeitsgruppe untersuchte die Rolle der Seneszenz hepatischer Sternzellen (HSZ) für die Fibrogenese an einem Modell der Leberzirrhose in Mäusen. Dabei fiel auf, dass sich seneszenten HSZ während der Leberfibrosierung ansammelten. Nach dem Stopp des auslösenden Agens (Tetrachlormethan) gingen die Quantitäten der aktivierten HSZ, der seneszenten HSZ und der Fibrose wieder zurück, bis die Organe wieder völlig ausgeheilt waren. Weitere Studien umfassten die gentechnische Ausschaltung wichtiger Seneszenzmediatoren wie p53 oder p16. Daraufhin konnten weniger HSZ im Seneszenzstadium nachgewiesen werden. Außerdem wurde eine verstärkte Proliferation von aktivierten HSZ beobachtet. Die Folge war eine deutlich gesteigerte Fibrose der Leber, die über den Heilungszeitraum der Organe in Wildtypmäusen hinaus bestehen blieb. Die Autoren schlossen daraus, dass der Seneszenzmechanismus entscheidend zur Termination der Fibrose und Regeneration der Leber beiträgt [Krizhanovsky *et al.*, 2008].

Untersuchungen zu Immunmodulatoren zeigten, dass seneszenten HSZ über eine verstärkte Expression dieser Modulatoren das Immunsystem aktivierten. In unmittelbarer Umgebung

von seneszenten HSZ fanden sich Lymphozyten inklusive natürlicher Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Es stellte sich heraus, dass besonders NK-Zell-stimulierende Zytokine in starkem Maße exprimiert wurden. Sowohl *in vitro* als auch im Lebergewebe selbst konnte nachgewiesen werden, dass NK-Zellen fähig sind, seneszente HSZ effizient zu eliminieren [Krizhanovsky *et al.*, 2008].

In vitro-Studien der eigenen Arbeitsgruppe zeigten ebenfalls einen Effekt des Immunsystems auf PSZ. Dabei wurde die Elimination von PSZ durch Kokulturen mit NK-Zellen sowohl in der Gruppe aktivierter PSZ als auch in der Gruppe Doxorubicin-behandelter, potentiell seneszenten PSZ stark gesteigert. Die Elimination von behandelten PSZ durch NK-Zellen verlief dabei deutlich effizienter als bei unbehandelten PSZ [Fitzner *et al.*, 2012].

1.4 Das Dibutylzinndichlorid-Pankreatitismodell

Um zügige Grundlagenforschung zum Thema Pankreatitis durchführen zu können, sind die wenigen operativ gewonnenen Gewebestücke von Patienten nicht ausreichend. Erschwerend kommt hinzu, dass die Erkrankung zum Operationszeitpunkt meist schon weit fortgeschritten ist und somit sowohl der Beginn als auch der Verlauf der Erkrankung in weiten Teilen schlecht betrachtbar wären. Um diese Problematik zu überwinden, wurden bereits viele Pankreatitismodelle an unterschiedlichen Tierarten etabliert [Lerch, Gorelick, 2013; Foster, 2014].

1.4.1 Allgemeines

Das Modell der Dibutylzinndichlorid (DBTC)-Pankreatitis wurde an Ratten entwickelt und hat verschiedene Vorteile. Es ist sehr einfach in der Handhabung, da die einmalige Injektion von DBTC genügt, um eine Pankreatitis auszulösen [Merkord *et al.*, 1997 und 1999]. Darüber hinaus sind über die DBTC-Dosis die Stärke der Erkrankung und ihre Chronifizierung steuerbar. Bei Gabe von 4 mg DBTC/kg Körpergewicht (KG) i. v. entwickelt sich eine milde und wieder ausheilende, akute Pankreatitis (AP) [Merkord, Henninghausen, 1989; Merkord, 2002]. Die Injektion von 6 und 8 mg DBTC/kg KG führt zunächst zu einer starken akuten Pankreatitis, welche dann eine Pankreasfibrose bewirken und einen chronischen Verlauf nehmen kann [Sparmann *et al.*, 1997; Merkord *et al.*, 1999; Merkord, 2002].

1.4.2 Histologische Betrachtungen

Die Arbeitsgruppe Sparmann *et al.* charakterisierte den Verlauf der DBTC-Pankreatitis auf histologischer Ebene. In der ersten Woche nach DBTC-Applikation entwickelte sich die AP mit interstitiellen Ödemen und zunehmender Infiltration des Organs v.a. durch Makrophagen und Granulozyten und in geringerem Ausmaß durch T-Zellen. Fibroblasten proliferierten, so dass in der zweiten Woche die Ablagerung von EZM im Pankreasgewebe begann. Zunächst entwickelte sich eine periduktale Fibrose, welche sich im weiteren Verlauf auf das Interstitium ausbreitete. Außerdem stieg in der zweiten und dritten Woche die Anzahl der T-Lymphozyten stark an. Am Ende des Beobachtungszeitraumes von 2 Monaten zeigte sich eine ausgeprägte interstitielle Fibrose. Das Bindegewebe war dabei durchsetzt von zahlreichen Makrophagen und T-Lymphozyten [Sparmann *et al.*, 1997].

1.4.3 Immunologische Betrachtungen

Die immunologische Komponente der DBTC-Pankreatitis wurde ebenfalls näher untersucht. So fand die Arbeitsgruppe um Sparmann und Hense während der akuten Phase der Pankreatitis im Gewebe eine gesteigerte mRNA-Expression von Zytokinen wie IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10 sowie TGF- β 1. Die für Lymphozyten spezifischen Zytokine bzw. Marker IFN- γ , IL-2 und IL-2R wurden erst ab einer Woche nach DBTC-Gabe im chronischen Verlauf, also nur bei hoher Dosis, gefunden [Sparmann *et al.*, 2001; Hense *et al.*, 2003]. Untersuchungen von Rieckeheer zeigten, dass ein Lymphozytentransfer aus Tieren mit einer DBTC-CP auf Tiere mit einer ausheilenden DBTC-AP für eine Verstärkung und Chronifizierung der Pankreatitis sorgte. Das Bild der Pankreatitis nach dem Transfer ähnelte dem Bild der DBTC-CP. Die Arbeit zeigt eine durch T-Lymphozyten übertragbare immunologische Komponente der durch DBTC ausgelösten CP auf [Rieckeheer, 2012].

1.4.4 Vergleichbarkeit zur humanen chronischen Pankreatitis

Die durch DBTC induzierte CP in Ratten ähnelt der humanen CP in verschiedener Hinsicht. Dazu zählen insbesondere die Fibrosierung des Pankreas und die Infiltration mit Makrophagen, Granulozyten sowie T-Lymphozyten [Klöppel, Maillet, 1993; Emmrich *et al.*, 1998].

1.5 Zielstellung

Hauptziel dieser Arbeit war es, anhand eines *in vivo* Modells der experimentellen Pankreatitis mit begleitender Organfibrose (chronische DBTC-Pankreatitis der Ratte) Anhaltspunkte für oder gegen eine Beteiligung von Seneszenzprozessen an der Regulation der Wundheilungsreaktion zu erhalten. Konkret wurde dazu die folgende Arbeitshypothese aufgestellt: Pankreatische Sternzellen durchlaufen nach einer Organschädigung einen Prozess, der aus *Aktivierung* (Proliferation; gesteigerte Synthese von extrazellulärer Matrix), *Seneszenz* (irreversibler Teilungsstopp) und *Elimination* der nach Abschluss der Wundheilung überschüssigen Zellen besteht.

Der zeitliche Ablauf der DBTC-CP sollte in den Teilaspekten Entzündung und Fibrose dargestellt und die Unterschiede von zwei verschiedenen Schweregraden der CP herausgearbeitet werden. Als Hauptfokus galt die Aktivierung und v. a. die Seneszenz von PSZ. Wenn Seneszenz in HSZ für eine Termination der Leberfibrose sorgte [Krizhanovsky *et al.*, 2008], so könnte dies auch für PSZ bei der Pankreasfibrose gelten. Auch die Kolokalisation der Entzündung mit aktivierten und seneszenten PSZ war dabei von Interesse, um die Rolle von Immunzellen im Gesamtprozess besser verstehen zu können. Angelehnt an die NK-Zellversuche von Krizhanovsky *et al.* (2008) sollte im Rahmen der CP auch untersucht werden, ob NK-Zellen einen wesentlichen Einfluss auf die Elimination von PSZ und damit auf die Beendigung der Fibrogenese haben.

Zur Komplettierung der Untersuchungen sollten im Rahmen von *in vitro* Studien grundlegende Mechanismen der Seneszenz pankreatischer Sternzellen untersucht werden.

Am Ende der Arbeiten sollte ein erstes Gesamtbild zur Bedeutung der Sternzellseneszenz für die Fibrogenese im Pankreas vorliegen, aus dem sich auch Ansatzpunkte für vertiefende Folgestudien ergeben.

2 Material

2.1 Allgemeines Labormaterial

Materialien	Hersteller
15 ml Reaktionsgefäße	Greiner
24-Well-Platten	Greiner
50 ml Reaktionsgefäße	Greiner
6-Well-Platten	Greiner
Deckgläschen	Roth
Glasplättchen	Roth
Objektträger	Marienfeld
Pipettenspitzen 0,1-1000 µl	Eppendorf
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf
Tissue-Tek	Sakura

2.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Axiophot - Lichtmikroskop	Zeiss
Axiovert 25 - Phasenkontrastmikroskop	Zeiss
CM 1850 - Kryostat	Leica
HERA cell 150 - Brutschrank	Thermo Scientific
LAMIN AIR HB2448 - Sterilwerkbank	Heraeus
Rocky®3D - Schüttler	Fröbel
Rotina 46R - Zentrifuge	Hettich
DM4000B - Immunfluoreszenzmikroskop	Leica

2.3 Zellkultur

2.3.1 Reagenzien und Lösungen für die Kultivierung

Das verwendete Iscove Basal Medium wurde mit 17 % FKS, 5 ml Penicillin/Streptomycin und 5 ml NEA versetzt.

Reagenz/Lösung	Bemerkungen	Hersteller
Iscove Basal Medium	3,024 g/l NaHCO ₃ mit stabilem Glutamin	Biochrom
Penicillin/Streptomycin		Gibco
Nicht essentielle Aminosäuren (NEA)		Gibco
Fetales Kälberserum (FKS)		PAA
Trypsin-EDTA 0,05 %	1:10 in PBS angesetzt	Gibco
PBS 1x	steril, pH 7,4	PAA
Trypanblau		Sigma-Aldrich

2.3.2 Antikörper und Lösungen für die α -SMA-Immunfluoreszenz

Antikörper	Herkunft	Hersteller	Sitz	Katalognummer
α -SMA	Maus	Sigma-Aldrich	Hamburg, D	A2547
Alexa Fluor® 488, FITC-Ak	Ziege	Invitrogen	Karlsruhe, D	A11001

Reagenz/Lösung	Bemerkungen	Hersteller
Methanol		Sigma-Aldrich
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)		Sigma-Aldrich
PBS 10x		Gibco
1%iges BSA (Bovines Serumalbumin)		Roche
Immunfluoreszenz-Einbettmedium	Glycerin 30 g Polyvinylalkohol 12 g Phenol 0,5 g 0,05 M Tris, pH 8,5	Roth Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich Roth

2.3.3 Reagenzien und Lösungen für die SA- β -Gal-Färbung

Reagenz/Lösung	Bemerkungen	Hersteller
PBS 10x	zu PBS 1x verdünnt	Gibco
Senescence β -Galactosidase Staining Kit:	Fixative Solution <u>Staining Solution:</u> 93 % 1x Staining Solution 1 % Staining Supplement A 1 % Staining Supplement B 5 % 20 mg/ml X-gal in DMF	New England BioLabs
Glycerin		Roth
Kernechtrot		Roth
Absoluter Ethanol		Zentralapotheke des Klinikums (ZAP)
Isopropanol		Sigma-Aldrich
Xylol		ZAP
Pertex		Medite

2.4 Gewebefärbungen

2.4.1 Antikörper und Lösungen für die APAAP-Färbung

Primär-Antikörper (AK)	Herkunft	Hersteller	Sitz	Katalognummer
CD4	Maus	Immunotools	Friesoythe, D	23150041
CD8a	Maus	BD Pharmingen	Heidelberg, D	554854
CD161	Maus	Immunotools	Friesoythe, D	23151611
Desmin	Maus	Sigma-Aldrich	Hamburg, D	D1033
HIS36	Maus	BD Pharmingen	Heidelberg, D	554900
Ki67	Maus	BD Pharmingen	Heidelberg, D	550609
RK-4	Maus	BMA Biomedicals	Augst, CH	T-3119
α -SMA (α -smooth muscle actin)	Maus	Sigma-Aldrich	Hamburg, D	A2547

Sekundär-AK				
Mouse Immunglobulins (Brücken-Ak)	Kaninchen	Dako	Glostrup, DK	Z0259
Tertiär-AK				
APAAP-Komplex (Alkalische- Phosphatase-Anti- Alkalische- Phosphatase)	Maus	Dako	Glostrup, DK	D0651

Reagenz/Lösung	Bemerkungen	Hersteller
Aceton		ZAP
TBS pH 7,4 - 7,6 (eingestellt mit 1 M HCl, ggf. 1 M NaOH)	1 l: Trisbase 6,05 g NaCl 8,75 g	Roth
FKS	Inaktiviert	PAA
Rattenserum	Zentrifugiertes Rattenblut Inaktiviert bei 56 °C für 30 min	-
Neufuchsin-Entwicklerlösung	1 ml: Fuchsin Chromogen 60 µl Fuchsin Activating Agent 60 µl Levamisol 60 µl Fuchsin Substrate Buffer 820 µl	Dako
Mayer's Hämatoxylin		Merck
Aquatex		Merck

2.4.2 Reagenzien und Lösungen für die SA- β -Gal-Färbung

Reagenz/Lösung	Bemerkungen	Hersteller
PBS 10x	zu PBS 1x verdünnt	Gibco
Senescence β -Galactosidase Staining Kit:	Fixative Solution <u>Staining Solution:</u> 93 % 1xStaining Solution 1 % Staining Supplement A 1 % Staining Supplement B 5 % 20 mg/ml X-gal in DMF	New England BioLabs
Kernechtrot		Roth
Absoluter Alkohol		ZAP
Xylol		ZAP
Pertex		Medite

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Verwendete Zellen

Für die Zellkultur fanden PSZ aus vier gesunden, drei Monate alten, männlichen Lewis-Inzucht-Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) Verwendung. Dabei wurden die Zellen von zwei der vier Ratten unmittelbar nach der Isolation in Aliquots für zwei separate Versuchsserien geteilt, so dass letztendlich sechs Zellisolate kultiviert wurden.

Die Pankreata wurden mit einem Gemisch aus Kollagenase P (0,05 %), Protease IX (0,02 %) und Deoxyribonuklease (0,1 %) in *Hank's buffered salt solution* behandelt. Anschließend wurden die PSZ mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen [Jaster *et al.*, 2002; Apte *et al.*, 1998]. Die Präparationsmethode führt zur Isolation noch teilungsinaktiver, so genannter ruhender PSZ, die sich durch einen hohen Gehalt an Vitamin A-haltigen Lipidtröpfchen auszeichnen [Apte *et al.*, 1998]. Die Zellen wurden von Prof. Dr. med. R. Jaster und seinen Mitarbeitern zur Kultivierung zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Kultivierung und Passagierung

Es wurden die noch durch wenige andere Zellen verunreinigten PSZ in 6-Well-Platten eingesetzt, 2 ml Medium hinzugefügt und fünf bis sechs Tage (bis zur Konfluenz der Zellen) im Brutschrank gelagert. Die Brutschrankbedingungen umfassten dabei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt der Luft und wassergesättigte Atmosphäre. Die verunreinigenden Zellen konnten unter den gegebenen Bedingungen nicht wachsen und starben ab. Die angewachsenen und vermehrten PSZ wurden im Schutz einer Sterilwerkbank abgeerntet. Dazu wurde das Medium entnommen, die Zellen mit PBS gespült und Trypsinlösung (10-fache Stammlösung 1 : 10 verdünnt mit sterilem PBS, pH 7,4) zugefügt. Nach Ablösung der Zellen wurde Medium dazugegeben und die Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen pipettiert. Durch Zentrifugieren bei 400 x g über 5 min setzten sich die Zellen am Boden des Röhrchens als festes Pellet ab. Der Überstand wurde abpipettiert und eine definierte Menge Medium hinzugegeben. Die Zellen wurden nun gut resuspendiert. Anschließend wurden 20 µl der Suspension entnommen, mit 20 µl Trypanblau vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Unter dem Mikroskop wurden nun die lebenden Zellen aller vier Quadranten der Zählkammer ausgezählt. Die Berechnung der Konzentration und der Gesamtzellzahl folgte. Schließlich wurden je 50 000

Zellen in drei Wells einer 6-Well-Platte eingesät und je 2 ml Medium ergänzt. Auf diese Weise wurde mit jeder der sechs Zellreihen verfahren. Diese Prozedur wurde jeweils im Abstand von sieben Tagen erneut durchgeführt.

3.1.3 α -SMA-Immunfluoreszenz

Im Zuge der Passagierung wurden von jeder Zellreihe je 2 x 5 000 Zellen in zwei Wells einer 24-Well-Platte eingesät und mit 0,5 ml Medium kultiviert. Zusätzlich wurden zwei Wells für das Einsäen von Zellen genutzt, welche als Negativkontrolle für die Färbung dienten. Dazu wurden die Zellen nicht mit dem Primärantikörper inkubiert. An einem zuvor in die Wells eingebrachten Glasplättchen wuchsen die Zellen über Nacht fest. Anschließend wurde mit PBS gewaschen und mit eiskaltem Methanol, welches mit DAPI (2,5 μ g DAPI/10 ml) gemischt wurde, für 10 min fixiert. Anschließend wurde erneut mit PBS gewaschen, 30 min bei Raumtemperatur mit 1%igem BSA (Bovines Serum Albumin) geblockt und mit dem Primärantikörper gegen α -SMA, verdünnt in 1%igem BSA (1 : 100), für 30 min inkubiert. Zwei weitere Waschgänge mit PBS folgten, bevor die Glasplättchen für 30 min mit dem Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten Sekundärantikörper, verdünnt in 1%igem BSA (1:300), versetzt wurden. Die Plättchen wurden nun erneut mit PBS gewaschen und mit Immunfluoreszenz-Einbettmedium auf Objektträger gebracht.

Die Arbeiten für die Immunfluoreszenz erfolgten mit möglichst wenig Licht, um ein Ausbleichen der Präparate zu verhindern. Die Objektträger wurden über Nacht abgedunkelt bei Raumtemperatur gelagert. Die folgende Langzeitlagerung erfolgte bei 4 °C.

3.1.4 Seneszenz-assoziierte- β -Galactosidase-Färbung

Die Einsaat in 24-Well-Platten für die SA- β -Galactosidase-Färbung erfolgte, abgesehen von hier fehlenden Negativkontrollen, wie für die α -SMA-Färbung beschrieben. Nach dem nächtlichen Anwachsen der Zellen an den Glasplättchen wurde das Medium durch 1 x *Fixative Solution* ersetzt. Nach 10 - 15 min Fixierung wurde mit 1 x PBS gewaschen und die *Staining Solution* (Zusammensetzung siehe Abschnitt 2.3.3) hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte ca. 24 h unter Brutschrankbedingungen. SA- β -Galactosidase exprimierende Zellen wandelten das Substrat in einen blauen Farbstoff um. Anschließend wurde für eine Lagerung von bis zu zwei Wochen Glycerin (70%ig) aufgebracht oder sofort die Gegenfärbung durchgeführt. Für diese wurde mit PBS gewaschen und Kernechtrot zu den Zellen gegeben. Nach zehnminü-

tiger Inkubation wurde kurz mit Aqua dest gewaschen und anschließend entwässert. Dafür wurden die Präparate nacheinander mit 70%igem und absolutem Ethanol, Isopropanol sowie Xylol bestückt. Zuletzt wurden die zellbesetzten Glasplättchen mit Pertex auf Objektträger aufgebracht.

3.2 Rattenmodell der DBTC-Pankreatitis

Die Tiere, welche verwendet wurden, waren männliche adoleszente Lewis-Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von ca. 200 g und einem Alter von 10 - 12 Wochen. Zur Induktion einer Pankreatitis bekamen sie zu diesem Zeitpunkt unter Ether-Kurznarkose 8 bzw. 6 mg DBTC/kg KG in die seitliche Schwanzvene gespritzt. Dabei sollten die verschiedenen Dosen unterschiedlich starke Pankreatitiden auslösen.

Das DBTC wurde in einer Konzentration von 0,1 g/ml in absolutem Ethanol gelöst und die benötigte Menge anschließend mit absolutem Ethanol (zwei Teile) und Glycerin (ca. 99%ig; drei Teile) auf 250 µl aufgefüllt [Sparmann *et al.*, 1997; Rieckeheer, 2012]. Dieses Volumen wurde den Tieren als Injektion verabreicht. Es wurden 23 Ratten 8 mg/kg KG appliziert (nachfolgend als 8 mg-Gruppe bezeichnet), 21 bekamen 6 mg/kg KG (nachfolgend als 6 mg-Gruppe bezeichnet). Zwölf unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle. Auf die Injektion von Lösungsmittel wurde verzichtet, nachdem Vorversuche der Arbeitsgruppe gezeigt hatten, dass zwischen Lösungsmittel-behandelten und unbehandelten Tieren keine Unterschiede bestehen. Nach 1, 2, 4 oder 8 Wochen wurden die Ratten durch eine Überdosis Pentobarbital getötet. Das Herz der Tiere wurde punktiert und große Teile des Blutes aspiriert. Auf diese Weise wurde eine relative Blutleere erzeugt. Nun wurden den Tieren Organe entnommen. Nach Entnahme des Pankreas wurden *Corpus* und *Cauda* in Tissue-Tek OCT Gewebeschutzlösung eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das *Caput pancreaticum* wurde für das Institut für Pathologie in 4%igem Paraformaldehyd eingelegt. Diese Tätigkeiten wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. R. Jaster und seinen Mitarbeitern übernommen. Alle Versuche wurden zuvor von der zuständigen Behörde, dem Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern, genehmigt (Aktenzeichen 7221.3-1.2-023/10).

3.3 DBTC-Pankreatitis und Depletion von NK-Zellen

Um Erkenntnisse über die Funktion von NK-Zellen im Verlauf einer Pankreatitis zu gewinnen, wurden sechs Ratten (Beschreibung siehe Abschnitt 3.2) einer NK-Zelldepletion unterzogen. Dies geschah mittels fünf intraperitonealer Injektionen von CD161-Antikörpern (AK), welche alle drei Tage in einer Menge von 100 µg pro Injektion appliziert wurden. Anschließend erfolgte die Gabe von 6 mg DBTC/kg KG wie oben beschrieben. Zum Erhalt der Depletion von NK-Zellen wurden die CD161-AK-Injektionen wöchentlich weitergeführt, bis die Tiere nach 4 Wochen getötet und die für die weiteren Versuche benötigten Organe entnommen wurden (siehe Abschnitt 3.2).

Als Kontrolle dienten sieben Ratten, welche statt der CD161-AK die gleiche Menge unspezifische IgG-AK (Intratect® Biotest Pharma, Dreieich, Deutschland) bekamen. Weiterhin erhielten auch diese Tiere eine Injektion von 6 mg DBTC/kg KG und wurden nach 4 Wochen aufgearbeitet. Auch diese Arbeiten wurden durch Prof. Dr. med. R. Jaster und seine Mitarbeiter ausgeführt.

Zwischen den Intensitäten der Pankreatitiden mit und ohne Intratect-Applikation bei sonst gleichen Voraussetzungen (Gabe von 6 mg DBTC/kg KG und Organentnahme nach 4 Wochen) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Daher wurden alle fünf Ratten der DBTC-Pankreatitis-Serie, welche diese Voraussetzungen erfüllten, in die Kontrollgruppe der Depletionsstudie mit aufgenommen. So ergab sich eine Gesamtzahl von zwölf Kontrolltieren. Das gesamte Depletionsprotokoll wurde im Vorfeld der Untersuchungen durch Mitglieder der Arbeitsgruppe optimiert. Dabei wurden die zur Auslösung und Aufrechterhaltung einer möglichst ausgeprägten NK-Zell-Depletion erforderlichen AK-Mengen und die Injektionsfrequenz ermittelt. Die Versuche wurden von der zuständigen Behörde genehmigt (siehe Abschnitt 3.2).

3.4 Gewebefärbungen

Die Pankreata, welche bei den Versuchen gewonnen wurden (siehe Abschnitt 3.2 und 3.3), fanden Verwendung für die allgemeine histologische Untersuchung in der HE (Hämatoxylin/Eosin)-Färbung, die Detektion von SA-β-Galactosidase sowie verschiedener Antigene.

3.4.1 HE-Färbung

Die mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Gewebeschnitte und deren Auswertung wurden vom Institut für Pathologie in Rostock bereitgestellt. Das dazu vorgesehene Pankreasstück wurde dafür zunächst in 4%igem Paraformaldehyd fixiert und dann in Paraffin eingebettet. Schließlich wurde nach Standardmethoden gefärbt und die Präparate anhand folgender Kriterien beurteilt:

- Parenchym:
 - Duktile Veränderungen: Dilatation, Nekrose
 - Azinäre Veränderungen: Vakuolisierung, Zystische Degeneration, Einzelzellnekrosen, Parenchymnekrosen, Tubuläre Komplexe

- Interstitium:
 - Ödem
 - Zellinfiltration: Granulozyten, Mononukleäre Zellen
 - Fibrose: Periduktal, Interstitiell

- Fettgewebe:
 - Nekrose
 - Lipomatose

- Langerhansinseln:
 - Reduzierte Anzahl
 - Mononukleäre Zellinfiltration

3.4.2 Immunhistochemie - APAAP-Färbung

3.4.2.1 Präparatherstellung

Die bei -80 °C in einem Block aus Tissue-Tek OCT Gewebeschuttlösung gelagerten Pankreasstücke wurden mit Hilfe eines Kryostaten bei -20 °C in 6 µm dicke Gewebestücken geschnitten und dann auf einen beschrifteten Objektträger überführt.

3.4.2.2 Färbemethode

Für die Immunhistochemie (IHC) wurde die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Färbung genutzt (siehe Abb. 3.1). Dabei wird ein gegen das Zielantigen gerichteter Primärantikörper verwendet, an dessen Fc-Teil ein sogenannter Brückenantikörper (Sekundärantikörper) bindet. In einem weiteren Arbeitsschritt wird die zweite Bindungsstelle des Brückenantikörpers vom Fc-Teil des APAAP-Komplexes (Tertiärantikörper mit gebundener Alkalischer Phosphatase) besetzt. Nun kann die Neufuchsin-Entwicklerlösung umgesetzt und die gewünschten Zielzellen rot angefärbt werden. Die Gegenfärbung erfolgt mit Mayer's Hämatoxylin.

Damit die Methode in der beschriebenen Weise funktionieren kann, müssen Primär- und Tertiärantikörper aus der gleichen Tierart stammen (hier Maus). Der Brückenantikörper dagegen muss von einer anderen Tierart gewonnen werden (hier Kaninchen). Alle Antikörper (AK) müssen verschieden zum Zielgewebe sein (hier Ratte).

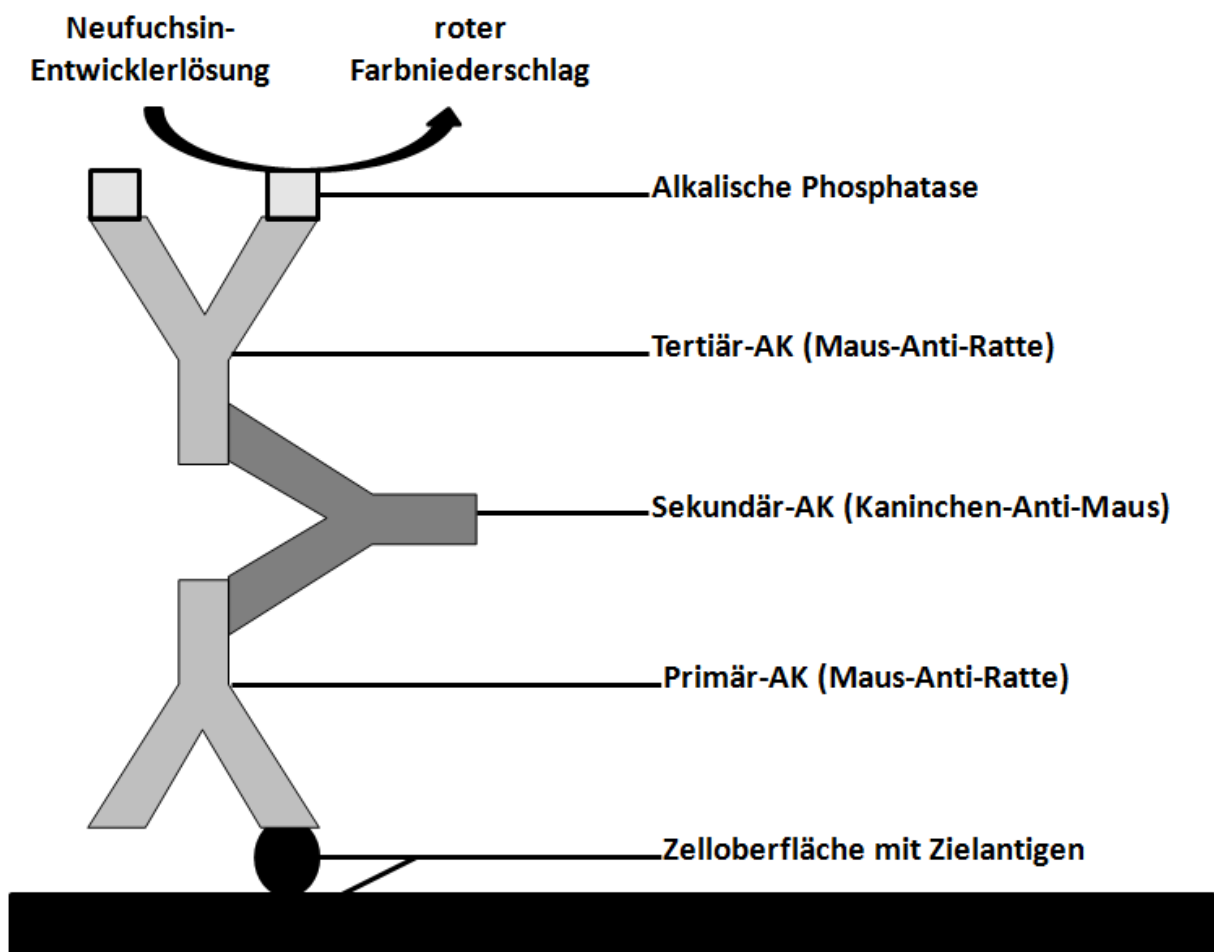


Abbildung 3.1: Prinzip der APAAP-Färbung. (Erklärung siehe Text)

Die Färbung des Gewebes erfolgte weitgehend nach Herstellerangaben.

Angefärbt wurden:

- CD4: Marker für T-Helferzellen
- CD8a: Marker für zytotoxische T-Lymphozyten
- CD161: Marker für NK-Zellen
- Desmin: Marker für myogene Zellen sowie Sternzellen
- HIS36: Marker für Makrophagen
- Ki67: Marker für Zellproliferation
- RK-4: Marker für Granulozyten
- α -smooth muscle actin (SMA): Marker für aktivierte PSZ

Die bei -80 °C gelagerten Gewebeschnitte wurden auf Raumtemperatur gebracht und in Aceton fixiert. Nach sofortigem kurzen Eintauchen in TBS pH 7,4-7,6 wurde das Gewebe mit einem Fettstift umkreist und mit dem Primärantikörper (verdünnt in TBS + 1 % inaktiviertes FKS) inkubiert. Dabei wurden die Präparate in eine verschlossene Feuchtkammer gelegt und 30 min bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurden die ungebundenen AK mit Aqua dest und TBS abgewaschen und der Sekundärantikörper (verdünnt mit TBS + 20 % inaktiviertem Rattenserum) aufgebracht. Die Inkubation und das nachfolgende Abwaschen der ungebundenen AK erfolgten analog zum Primärantikörper. Dann wurde das Gewebe mit dem letzten AK (verdünnt mit TBS) versehen, welcher eine Alkalische Phosphatase gebunden hat. Wieder wurde unter oben genannten Bedingungen inkubiert und gewaschen. Danach wurde Neufuchsin-Entwicklerlösung (Zusammensetzung siehe Abschnitt 2.4.1) auf das Gewebe gegeben. Die Alkalische Phosphatase des dritten AK setzte Bestandteile dieser Lösung in einen roten Farbstoff um und färbte so die gewünschten Zellen. Die Inkubation erfolgte in einer Feuchtkammer auf einem Schüttelinkubator je nach Zielantigen unterschiedlich lange bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Präparate mit TBS gespült und in Aqua dest überführt. Danach wurden sie mit Mayer's Hämatoxylin gegengefärbt und mit Leitungswasser gewaschen. Abschließend wurde das Gewebe mit einem Tropfen Aquatex versehen und mit einem Deckgläschen geschützt.

3.4.2.3 Auswertung

Alle immunhistochemischen Präparate wurden verblindet und mit Hilfe eines Lichtmikroskops ausgewertet. Dabei wurden die gefärbten Zellen bei 400facher Vergrößerung in je 10 Gitterquadraten gezählt. Angegeben wurden die Ergebnisse in Zellen/mm². Im Falle des α -SMA erwies sich eine exakte Zählung aufgrund der flächenhaften Natur der Anfärbung als unmöglich. Deshalb wurde hier auf ein semiquantitatives Scoring-System zurückgegriffen. Score 0 bedeutet die flächige Anfärbung von 0 - 5 % des Gewebes, 1 entspricht 6 - 15 %, 2 wurde mit 16 - 25 % gleichgesetzt und 3 wurde für > 25% vergeben.

3.4.3 Seneszenz-assoziierte- β -Galactosidase-Färbung

3.4.3.1 Färbemethode

Die SA- β -Gal-Färbung wurde mit Hilfe des *Senescence β -Galactosidase Staining Kits* durchgeführt. Hierfür wurden ebenfalls die bei -80 °C gelagerten Gefrierschnitte verwendet. Diese wurden auf Raumtemperatur gebracht und mit dem Fettstift umkreist. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe von 1x *Fixative Solution* für 10 - 15 min fixiert und in 1 x PBS gewaschen. Danach wurde das Präparat mit der vorbereiteten *Staining Solution* (Zusammensetzung siehe Abschnitt 2.4.2) bestückt und ca. 24 h bei 37 °C gelagert. Dies erfolgte in einer geschlossenen Feuchtkammer und mit Hilfe eines Brutschrankes. Zellen, welche das Enzym SA- β -Galactosidase exprimierten, setzten das Substrat in einen blauen Farbstoff um und färbten sich auf diese Weise an.

Die Gegenfärbung wurde nach einem kurzen Waschgang in PBS mit Kernechtrot für 10 min durchgeführt. Dann wurde das Gewebe kurz in Aqua dest gewaschen und in absolutem Alkohol sowie in Xylol entwässert. Die Einbettung erfolgte mit Pertex.

3.4.3.2 Auswertung

Da das Zählen der Zellen durch eine teilweise flächige Anfärbung unmöglich war, wurde ebenfalls ein semiquantitatives Scoring-System genutzt. Dabei wurde für die Färbung von wenigen Zellen innerhalb des Präparates eine 0 und für viele Zellen und/oder mindestens einen klaren Fokus (bis maximal 5 % des Gewebes) eine 1 vergeben. Eine 2 bekam das Gewebe für flächige bandartige blaue Zonen, welche zwischen 6 und 25 % des Gewebes färbten. Massive Blaufärbungen mit > 25 % des Präparates wurden mit 3 beziffert.

3.5 Statistik

Alle erhobenen Daten sind als Mittelwerte \pm SEM (*standard error of the mean*) in den Diagrammen dargestellt. Die statistische Analyse wurde mittels des Programmes *IBM SPSS Statistics 20* durchgeführt. Für die Ermittlung der statistischen Signifikanzen wurde der Mann-Whitney-U-Test genutzt. Ergebnisse wurden dann als statistisch signifikant betrachtet, wenn die Wahrscheinlichkeit eines Irrtums p kleiner als 0,05 war. Zusätzlich wurden Ergebnisse, welche eine Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 0,01 aufwiesen als statistisch hoch signifikant betitelt.

4 Ergebnisse

4.1 Zellkultur

Die *in-vitro*-Versuche beinhalteten die Kultivierung von PSZ, welche dann für Studien zur Expression der Marker SA- β -Gal und α -SMA herangezogen wurden.

Für die α -SMA-Färbung wurden die Zellen auf Glasplättchen überführt und mit dem AK gegen α -SMA und zum Abschluss mit dem FITC-markierten Anti-Maus-Immunglobulin-AK inkubiert. Die Auswertung der Proben erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Beispielbilder sind in Abb. 4.1 dargestellt.

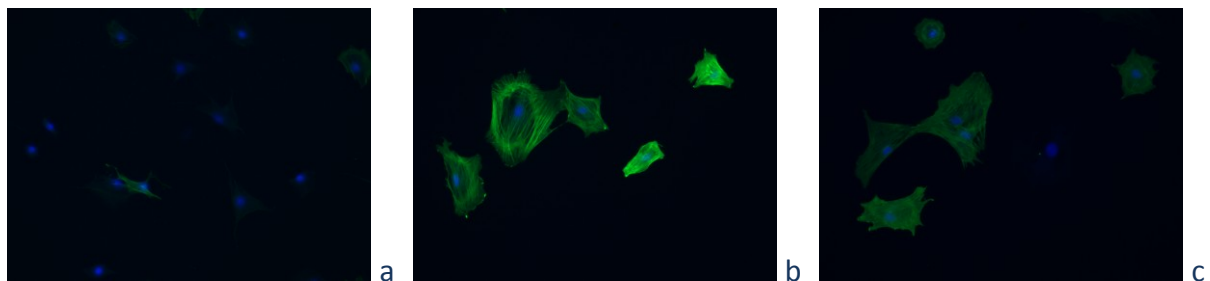


Abbildung 4.1: Expression von α -SMA in kultivierten PSZ.

PSZ wurden kultiviert wie im Methodenteil beschrieben. Die Zellen wurden abgeerntet, auf Deckgläschen gesät und α -SMA mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Gezeigt sind repräsentative Bilder der Passage 1 (Abb. a), 4 (Abb. b) und 6 (Abb. c). Eine Passage entspricht dabei 7 Tagen Kulturdauer. Originalvergrößerung x200

Am Ende der ersten Passage ergab sich ein Mittelwert von $14,3 \pm 3,1$ % α -SMA-positiver Zellen (Abb. 4.2, P1). Bereits zur zweiten Passage (P2) stieg die Expression von α -SMA stark an, so dass die Differenz zur ersten Passage hoch signifikant wurde. Nach der vierten Passage (P4) wurde das Maximum mit einem Mittelwert von $75,4 \pm 2,9$ % erreicht. Bis zur siebenten Passage (P7) wurde ein leichter Rückgang der als α -SMA-positiv klassifizierten Zellen auf $66,4 \pm 4,9$ % verzeichnet. Der hoch signifikante Unterschied gegenüber der ersten Passage blieb dennoch bestehen.

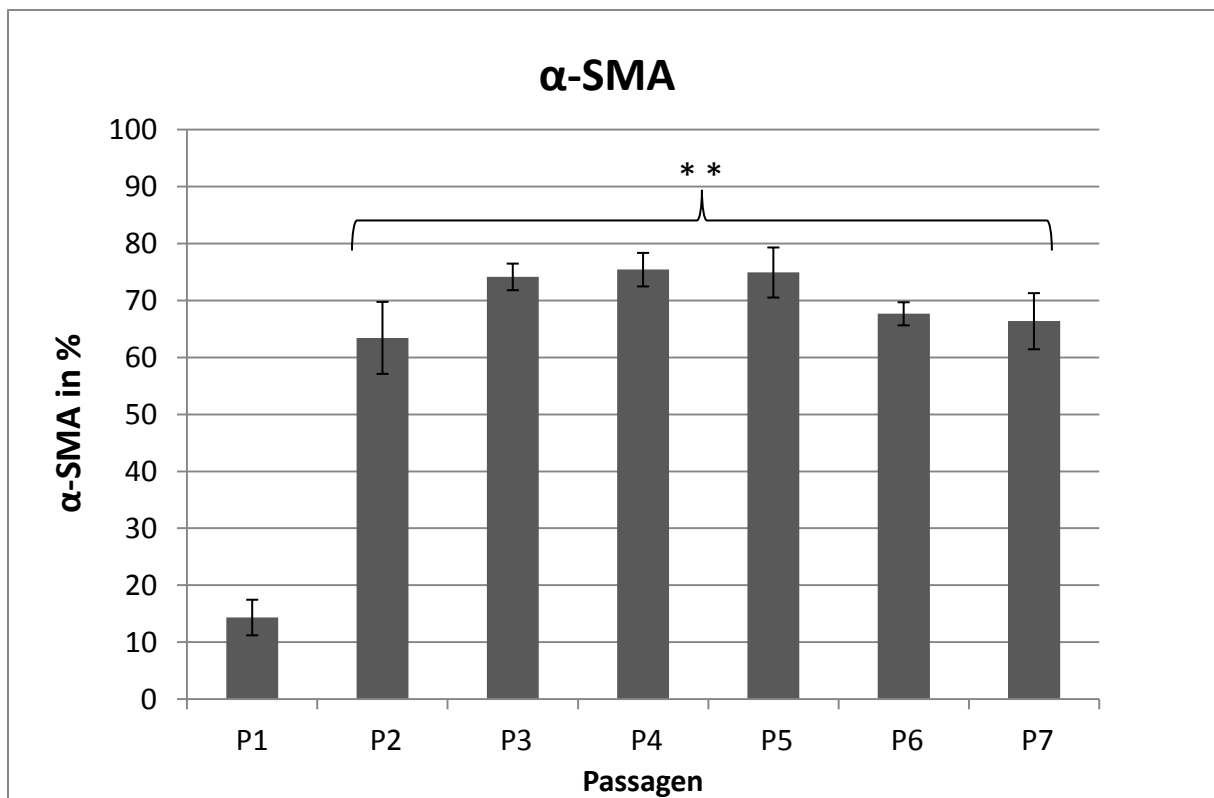


Abbildung 4.2: Aktivierung von kultivierten PSZ (Zeitverlauf der α -SMA-Expression).

PSZ wurden kultiviert wie im Methodenteil beschrieben. Die Zellen wurden abgeerntet, auf Deckgläschen gesät und α -SMA mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Eine Passage entspricht dabei 7 Tagen Kulturdauer. Die Zahl α -SMA-positiver Zellen wurde fluoreszenzmikroskopisch anhand verblindeter Proben bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der α -SMA-positiven Zellen in Prozent aller Zellen \pm SEM (n = 5 - 6 Proben). **p < 0,01 gegenüber P1

Auch für die SA- β -Gal-Färbung wurden die PSZ zunächst mittels Trypsin gewonnen. Sie wurden auf Glasplättchen pipettiert und wuchsen dort auf der Oberfläche an. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe des *Senescence β -Galactosidase Staining Kits* angefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Abb. 4.3 zeigt Fotografien von Beispielpräparaten.

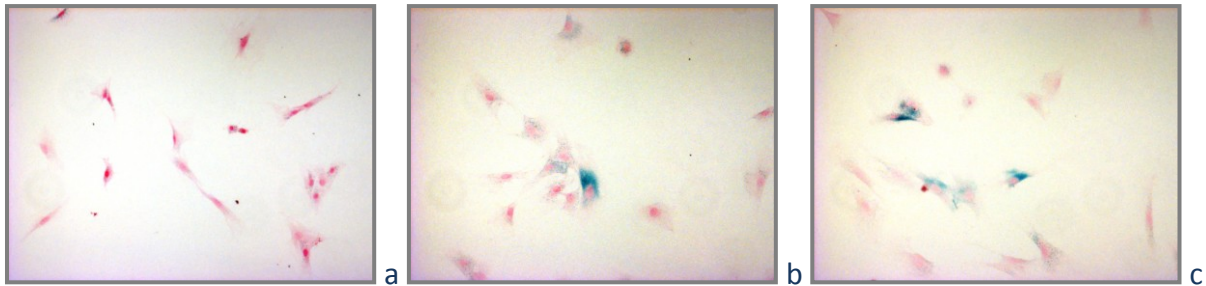


Abbildung 4.3: Expression von SA- β -Gal in kultivierten PSZ.

PSZ wurden kultiviert wie im Methodenteil beschrieben. Die Zellen wurden abgeerntet, auf Deckgläschen gesät und mittels *Senescence β -Galactosidase Staining Kit* angefärbt. Gezeigt sind repräsentative Bilder der Passage 1 (Abb. a), 4 (Abb. b) und 6 (Abb. c). Eine Passage entspricht dabei 7 Tagen Kulturdauer. Originalvergrößerung: x100

Die erste Passage war von sehr wenigen SA- β -Gal-positiven Zellen gekennzeichnet. Der Mittelwert lag entsprechend bei $2,4 \pm 1,5$ % (Abb. 4.4, P1). Zur zweiten Passage (P2) stieg die Expression von SA- β -Gal in den PSZ stark an und erreichte ihr Maximum mit einem Mittelwert von $23,6 \pm 4,3$ %. Der Expressionsunterschied zur ersten Passage war hoch signifikant. Bis zur vierten Passage (P4) fiel die Anzahl der SA- β -Gal-positiven Zellen wieder auf einen Mittelwert von $7,5 \pm 2,7$ % ab, so dass der Unterschied zu P1 mit einem p-Wert von 0,065 knapp die Signifikanzgrenze unterschritt. Zu den letzten drei Passagen erreichte der Anteil SA- β -Gal-exprimierender Zellen wieder den hoch signifikanten Bereich im Vergleich zu P1. Das neuerliche Maximum unter diesen Passagen ergab sich zum Zeitpunkt der sechsten Passage (P6) mit einem Mittelwert von $19,6 \pm 3,6$ %.

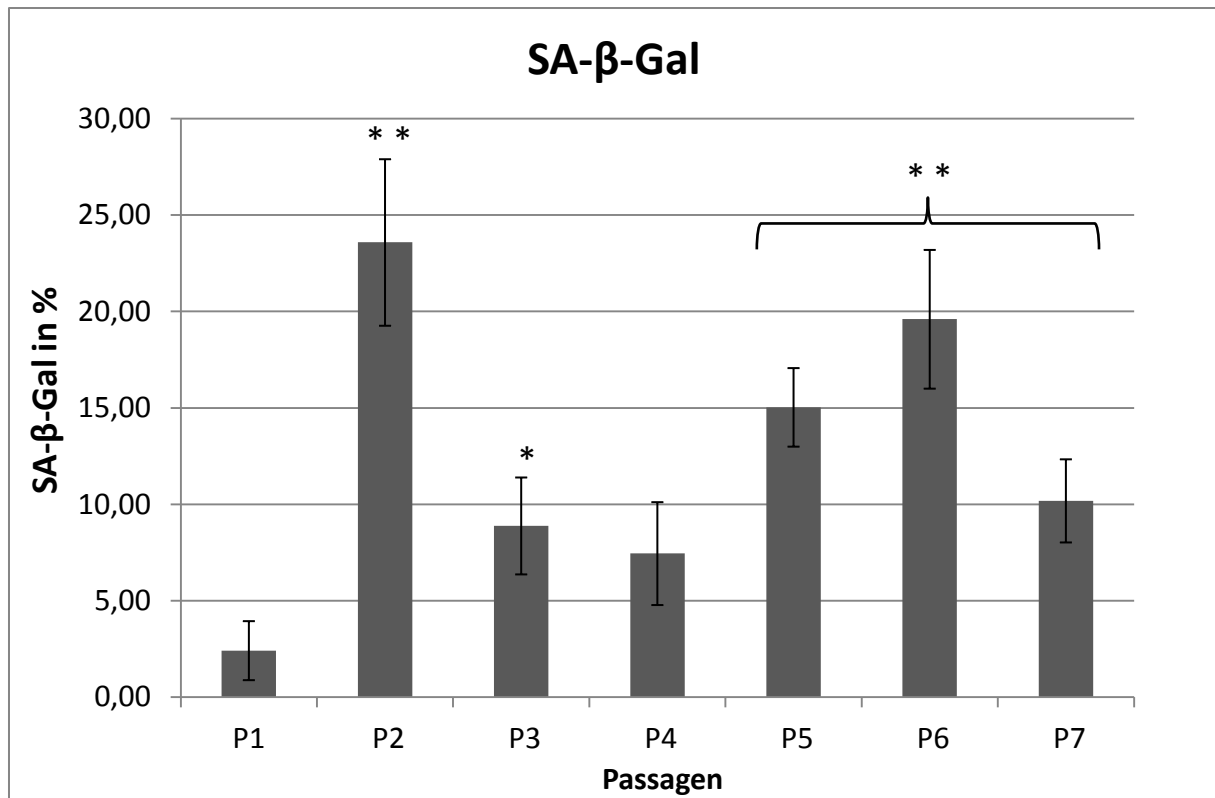


Abbildung 4.4: Seneszenz von kultivierten PSZ (Zeitverlauf der SA-β-Gal-Expression).

PSZ wurden kultiviert wie im Methodenteil beschrieben. Die Zellen wurden abgeerntet, auf Deckgläschen gesät und mittels *Senescence β-Galactosidase Staining Kit* angefärbt. Eine Passage entspricht dabei 7 Tagen Kulturdauer. Die Zahl β-Gal-positiver Zellen wurde lichtmikroskopisch anhand verblindeter Proben bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der SA-β-Gal-positiven Zellen in Prozent aller Zellen \pm SEM (n = 6 Proben). *p < 0,05 gegenüber P1; **p < 0,01 gegenüber P1

Die Daten zeigen sowohl bei der α -SMA- als auch bei der SA-β-Gal-Expression einen Anstieg im Verlauf der Kulturzeit von PSZ. α -SMA erreichte dabei während Passage 4 sein Maximum. Die Expression von SA-β-Gal zeigt einen doppelgipfligen Verlauf. Im Vergleich zur P1 war der Anteil SA-β-Gal positiver Zellen dennoch durchgängig erhöht. Festzustellen ist auch, dass seneszente Zellen über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg in der Minderheit blieben.

4.2 DBTC-Pankreatitis

4.2.1 Allgemeines

Zu den durchgeführten APAAP-Färbungen wurden entsprechende Negativkontrollen angefertigt, bei denen auf den Primärantikörper verzichtet wurde. Abb. 4.5 zeigt ein Beispiel und verdeutlicht, dass es nahezu keine Hintergrundfärbung gab.

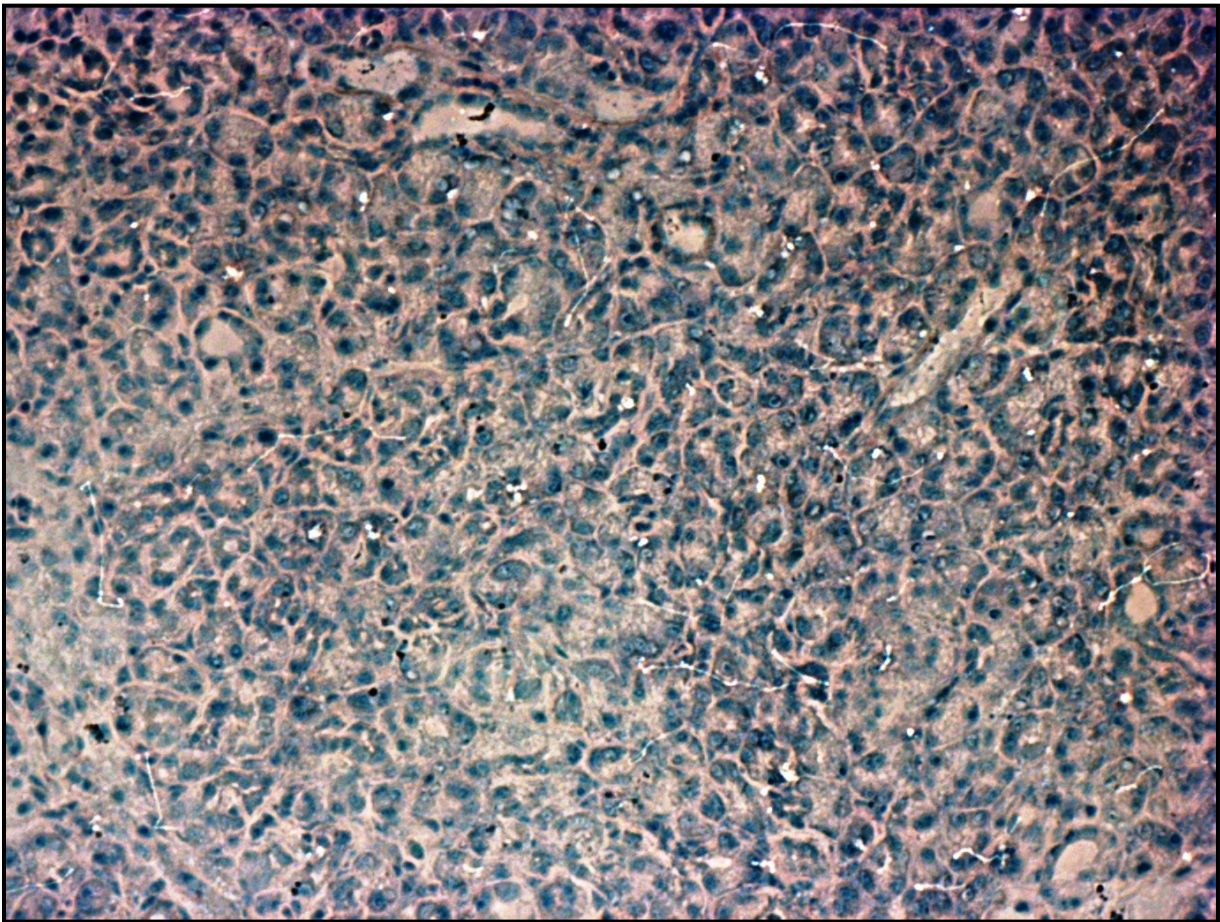


Abbildung 4.5: Beispiel einer Negativkontrolle.

Die Negativkontrolle wurde nach der APAAP-Methode gefärbt, erfolgte ohne Primärantikörper und immer parallel zur eigentlichen Färbung mit Primärantikörpern gegen die jeweiligen Marker. Das Gewebe stammt von einer Ratte, welche 8 mg DBTC/kg KG erhielt und nach einer Woche getötet wurde. Originalvergrößerung x100

Als Kontrollen gegenüber den erkrankten Tieren wurden gesunde Ratten verwendet, welche 0,9 % NaCl-Lösung injiziert bekamen oder unbehandelt blieben. Beide Gruppen wurden zu einer Kontrollgruppe zusammengefasst, da in der Histologie keine Unterschiede beobachtet wurden.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe sind nachfolgend die Ratten dargestellt, welche 6 bzw. 8 mg DBTC/kg KG erhielten und nach 1, 2, 4 oder 8 Wochen getötet wurden. Dabei wurden Zeitpunkt 1 (1 Woche) und Zeitpunkt 2 (2 Wochen) in den jeweiligen Dosisgruppen zusammengefasst, weil zwischen den beiden Zeitpunkten keinerlei systematische Unterschiede beobachtet wurden (Daten nicht gezeigt).

4.2.2 HE-Färbung

4.2.2.1 Entzündung

Die Entzündungsintensität der Pankreata wurde anhand der im Methodenteil genannten Kriterien und deren Zusammenfassung in einem Scoring-System (0 - 3) erfasst. In Abb. 4.6 werden die histologischen Befunde dargestellt.

Die Bauchspeicheldrüsen der Kontrolltiere (Abb. 4.6, Kontrolle) zeigten in der HE-Färbung keine Auffälligkeiten.

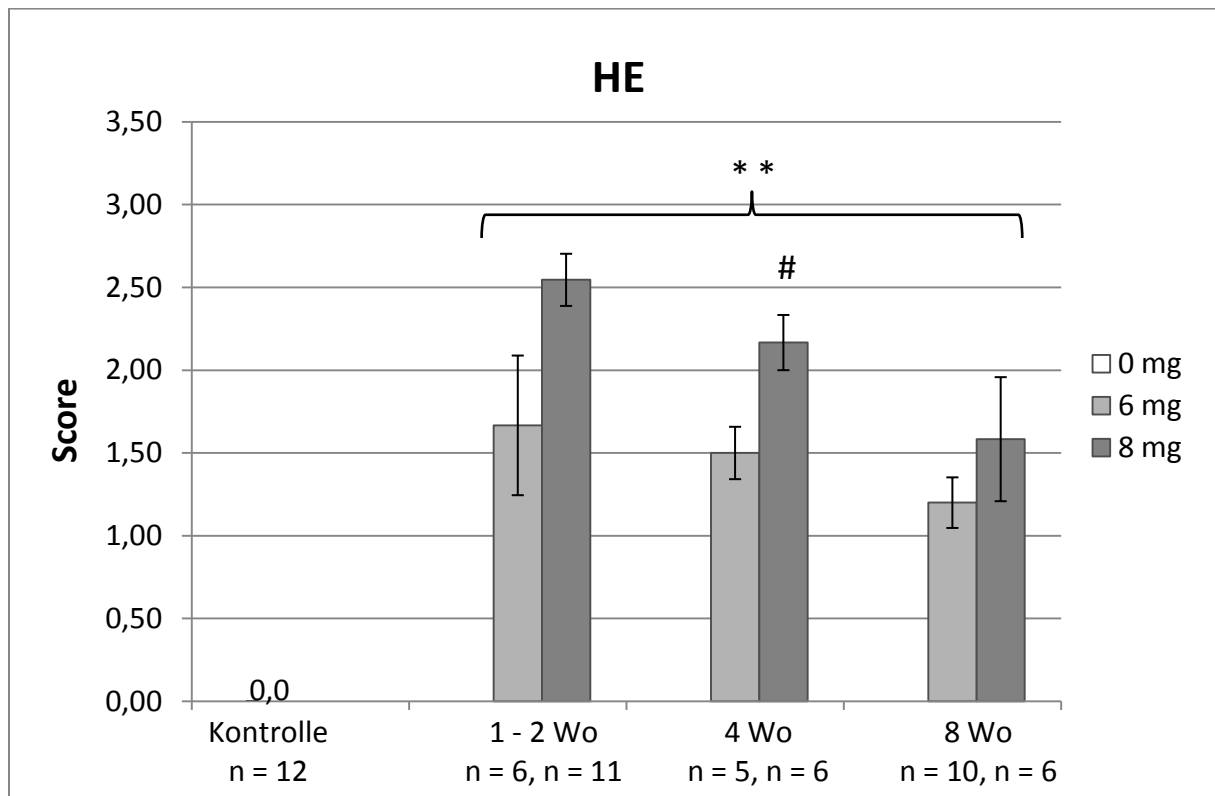


Abbildung 4.6: Histologische Befunde von Rattenpankrea beurteilt an HE-Färbungen.

Junge gesunde Ratten erhielten 6 bzw. 8 mg DBTC/kg KG als einmalige intravenöse Injektion. Es entwickelte sich dosisabhängig eine Pankreatitis unterschiedlicher Stärke. Die Tiere wurden nach 1, 2, 4 oder 8 Wochen getötet und die Pankreata entnommen. Anschließend wurde das Gewebe mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Verschiedene Erkrankungskriterien wurden lichtmikroskopisch anhand verblindeter Proben beurteilt und in einem semiquantitativen Score von 0 - 3 zusammengefasst. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus n unabhängigen Proben dargestellt. **p < 0,01 gegenüber Kontrollen; #p < 0,05 gegenüber der Gruppe mit der niedrigeren Dosis des jeweiligen Zeitpunktes (Mann-Whitney-Test)

Die Applikation von DBTC führte zu einer Entzündung der Pankreata. In der 6 mg-Gruppe (hellgraue Säulen) war das Ausmaß histologischer Veränderungen zu jedem Zeitpunkt

gegenüber der Kontrollgruppe hoch signifikant. Das Maximum fand sich nach 1 - 2 Wochen. Im zeitlichen Verlauf nahmen die Veränderungen wieder ab. Die Werte der 8 mg-Gruppe (dunkelgraue Säulen) ähnelten diesem Muster, waren allerdings durchgängig und zum Zeitpunkt 4 Wochen auch statistisch signifikant höher.

4.2.2.2 Fibrose

In Abbildung 4.7 ist ein Beispiel einer HE-Färbung dargestellt. Die periduktale und interstitielle Fibrose ist deutlich zu erkennen.

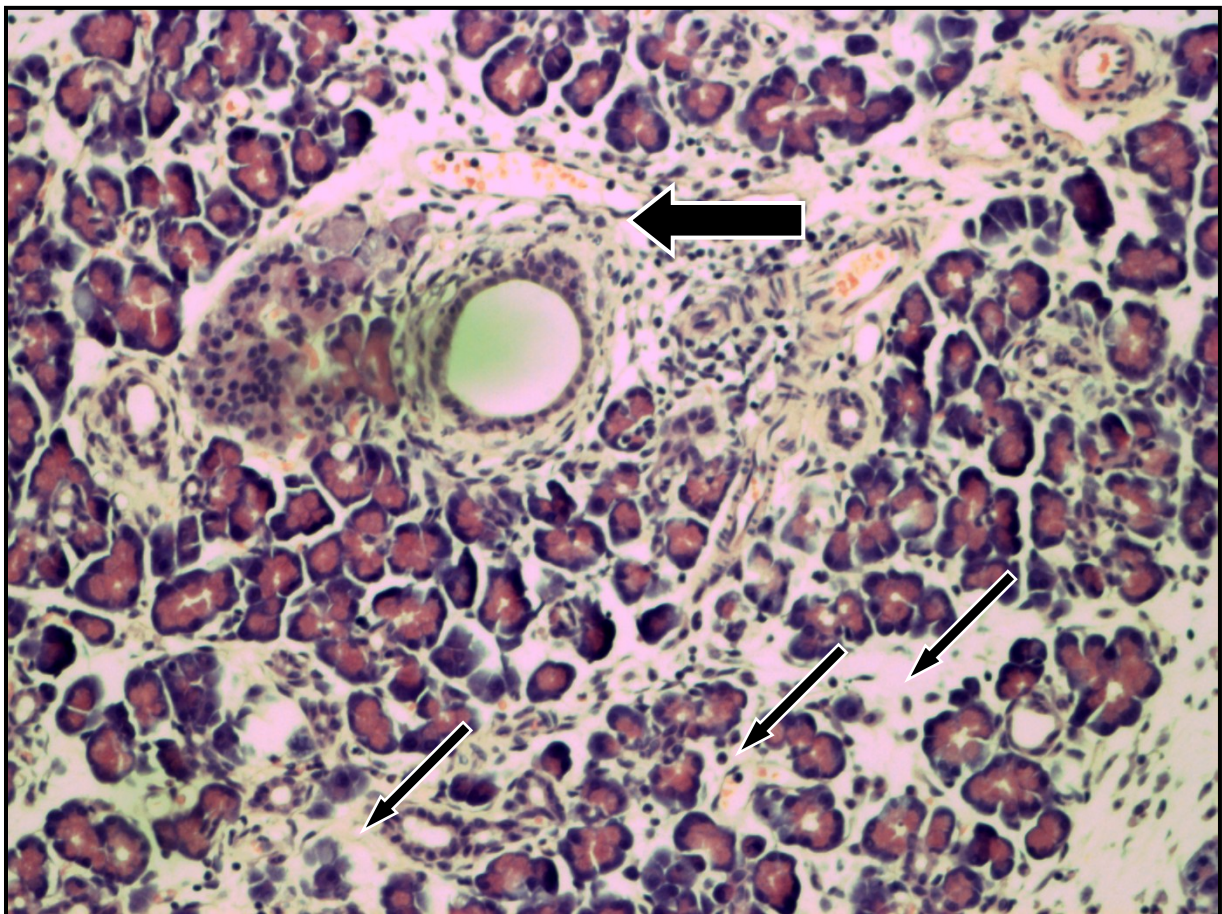


Abbildung 4.7: Periduktale und interstitielle Fibrose bei einer Ratte mit DBTC-Pankreatitis.

Das Gewebe stammt von einer Ratte, welche 8 mg DBTC/kg KG erhielt und nach einer Woche getötet wurde. Das formalinfixierte Pankreasgewebe wurde in Paraffin eingebettet, geschnitten und HE gefärbt. Die Pfeile in der Abbildung zeigen auf Areale mit periduktalem (dicker Pfeil) bzw. interstitieller (dünne Pfeile) Fibrose. Originalvergrößerung x100

Der Fibrosegrad wurde in den Kategorien periduktale und interstitielle Fibrose (Score je 0 - 3) erfasst und zu einem Score von 0 - 6 zusammengefasst. Wie Abb. 4.8 zeigt, trat bei den Tieren der Kontrollgruppe keine Fibrose auf. In beiden Versuchsgruppen wurde dagegen

ein Anstieg des Scores beobachtet. Die 6 mg-Gruppe (hellgraue Säulen) erreichte ihr Maximum nach 1 - 2 Wochen. Im Verlauf zeigte sich tendenziell eine Abnahme der Fibrose. In der 8 mg-Gruppe (dunkelgraue Säulen) war die Fibrose nach 1 - 2 Wochen vergleichbar mit der niedriger dosierten Gruppe. Das Maximum fand sich dagegen erst nach 4 Wochen. Es bestand daher die Tendenz einer stärkeren Fibrose. Ein signifikanter Unterschied konnte zwischen beiden Gruppen aber nicht festgestellt werden.

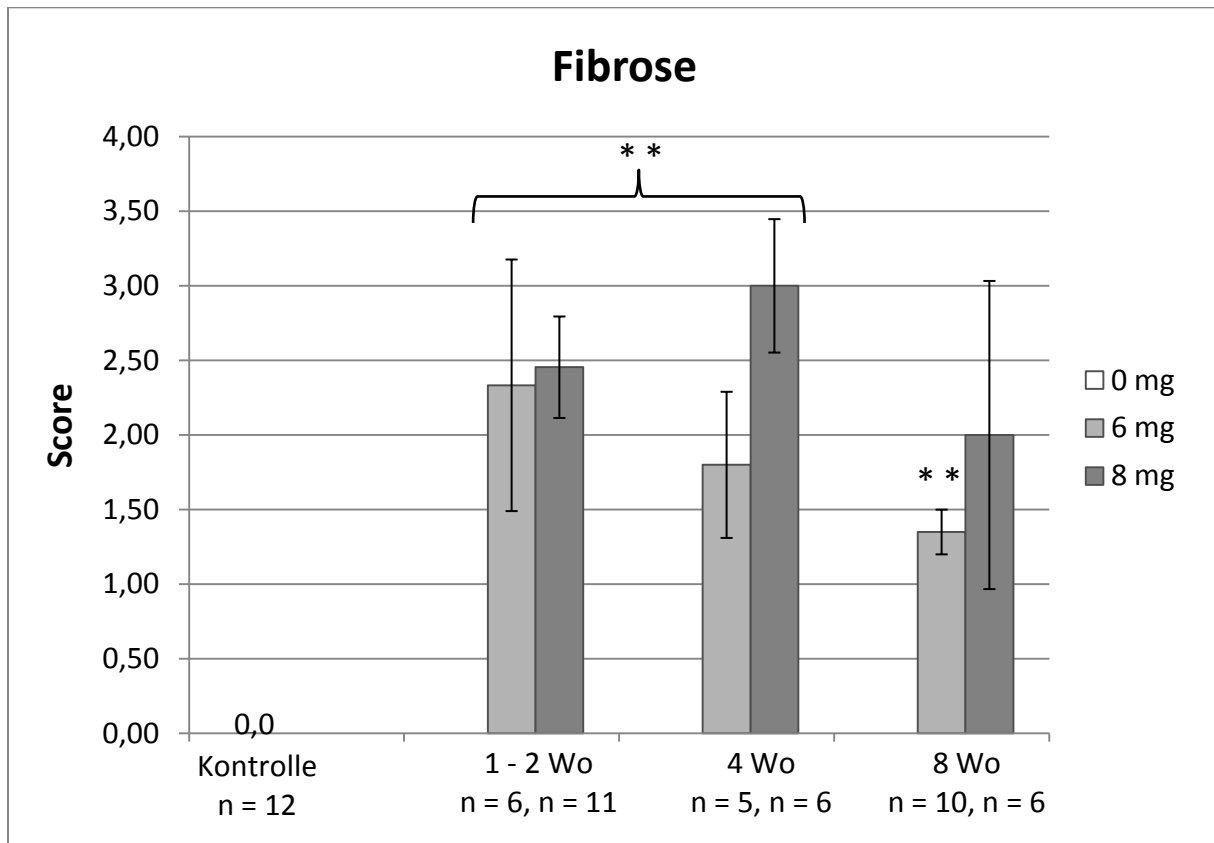


Abbildung 4.8: Quantifizierung der periduktalen und interstitiellen Fibrose bei Ratten mit DBTC-Pankreatitis.

Junge gesunde Ratten erhielten 6 bzw. 8 mg DBTC/kg KG als einmalige intravenöse Injektion. Es entwickelte sich dosisabhängig eine Pankreatitis unterschiedlicher Stärke. Die Tiere wurden nach 1, 2, 4 oder 8 Wochen getötet und die Pankreata entnommen. Anschließend wurde das Gewebe mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Die periduktale und interstitielle Fibrose wurde anhand verblindeter Proben jeweils lichtmikroskopisch auf ihre Stärke beurteilt (je 0 - 3) und in einem semiquantitativen Score von 0 - 6 zusammengefasst. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus n unabhängigen Proben dargestellt. **p < 0,01 gegenüber Kontrollen (Mann-Whitney-Test)

4.2.3 SA- β -Gal-Färbung (Seneszente Zellen)

Die SA- β -Gal-Färbung wurde an frischen Kryostatschnitten durchgeführt, wie im Methodenteil beschrieben. Anschließend erfolgte die Auswertung am Lichtmikroskop mit Hilfe eines semiquantitativen Scores (siehe Abschnitt 3.4.3). Abbildung 4.9 zeigt SA- β -Gal gefärbtes Gewebe eine Woche nach Applikation von 8 mg DBTC/kg KG.

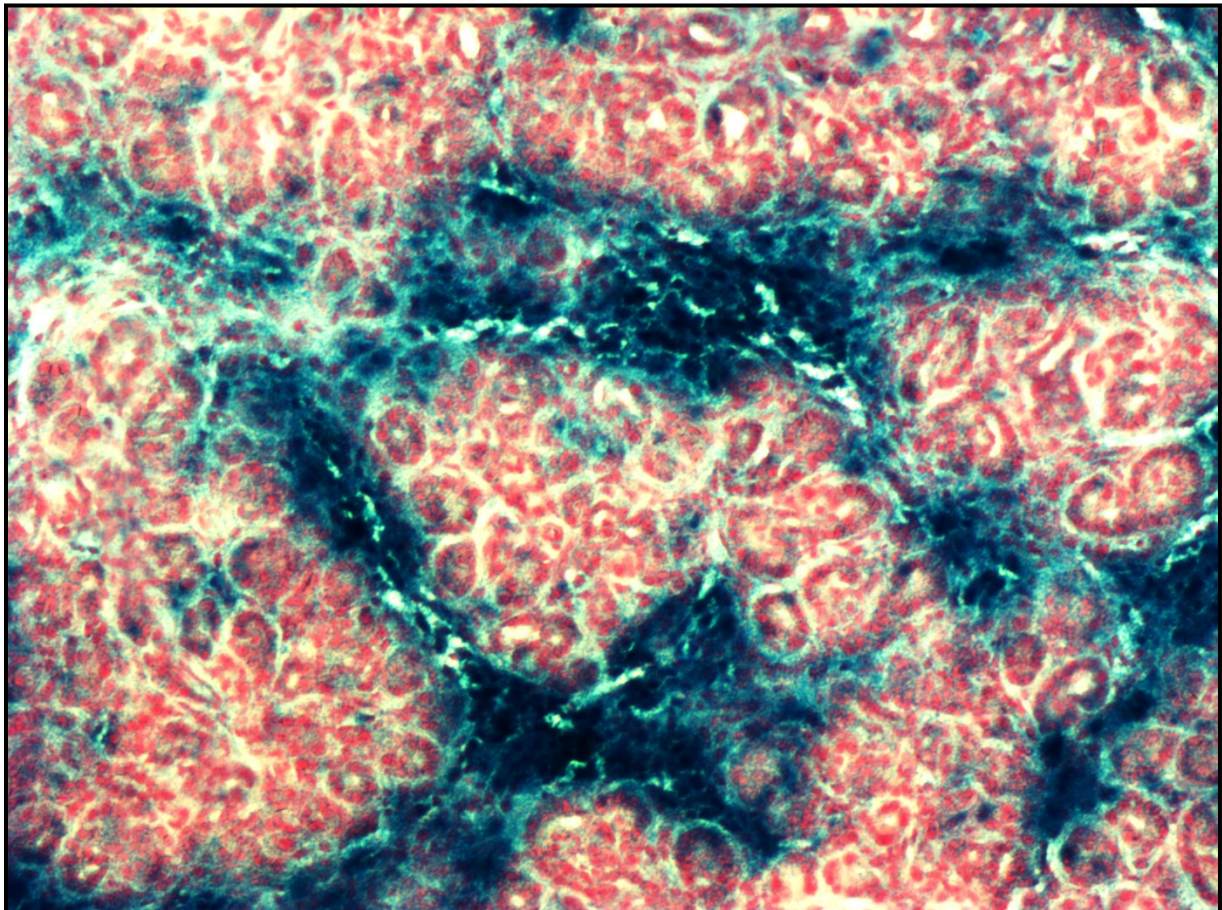


Abbildung 4.9: SA- β -Gal-Färbung einer Ratte mit DBTC-Pankreatitis.

Das Gewebe stammt von einer Ratte, welche 8 mg DBTC/kg KG erhielt und nach einer Woche getötet wurde. Nach Anfertigung von frischen Gefrierschnitten wurde SA- β -Gal (blau) angefärbt. Originalvergrößerung x100

Unter den Kontrollen fanden sich nur sehr vereinzelt SA- β -Gal-positive Zellen. Daher beträgt der Score hier 0 (Abb. 4.10, Kontrolle). Die Gabe von 6 mg DBTC/kg KG bewirkte einen Anstieg SA- β -Gal-positiver Zellen im nicht signifikanten Bereich mit einem Maximum nach 4 Wochen (hellgraue Säulen). In der höher dosierten Gruppe (dunkelgraue Säulen) stieg der Wert nach 1 - 2 Wochen in den hoch signifikanten Bereich und erreichte zu diesem Zeitpunkt auch sein Maximum. Im Verlauf nahm der Score jedoch ab, so dass er sich nach 8 Wochen wieder im nicht signifikanten Bereich befand. Der durchschnittliche Score zeigte sich zu jedem Zeitpunkt über dem der niedriger dosierten Gruppe. Zum frühesten Untersuchungszeitpunkt war dieser Unterschied hoch signifikant.

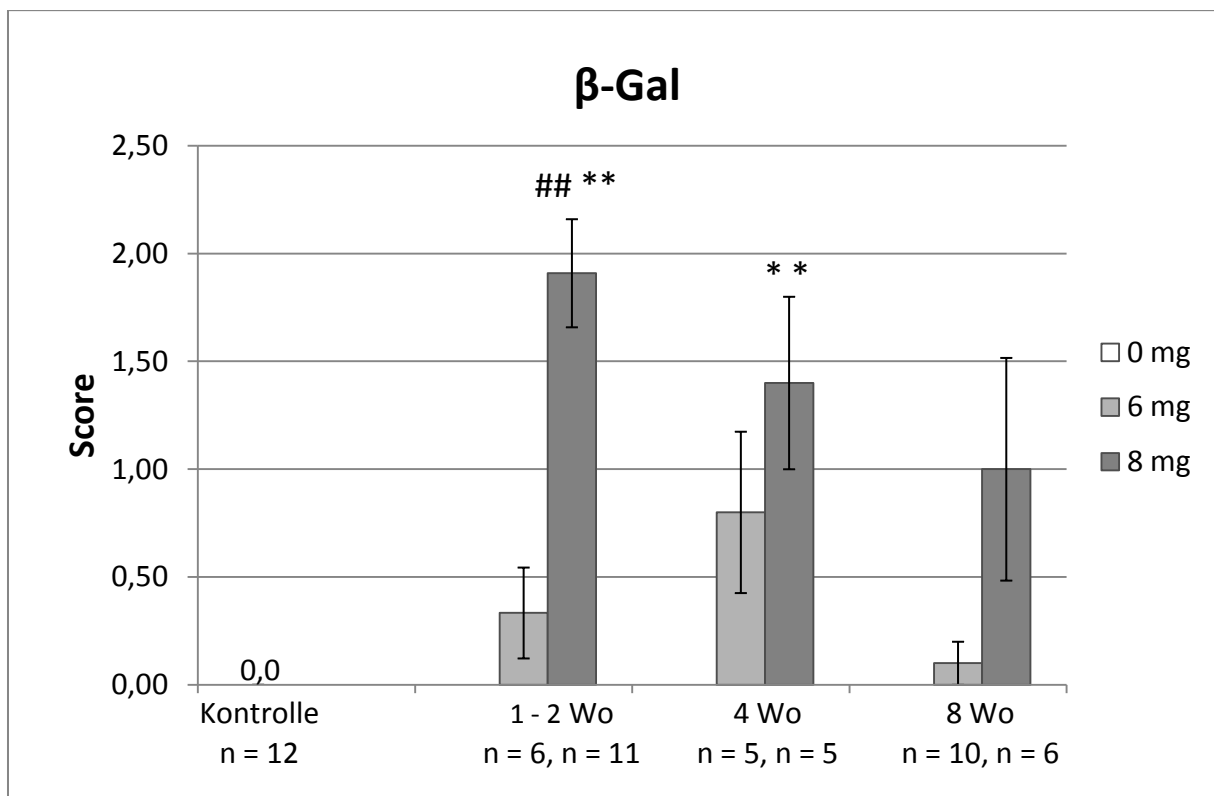


Abbildung 4.10: Infiltration von SA- β -Gal-positiven Zellen im Pankreasgewebe.

Junge gesunde Ratten erhielten 6 bzw. 8 mg DBTC/kg KG als einmalige intravenöse Injektion. Es entwickelte sich dosisabhängig eine Pankreatitis unterschiedlicher Stärke. Die Tiere wurden nach 1, 2, 4 oder 8 Wochen getötet und die Pankreata entnommen. Anschließend wurde SA- β -Gal angefärbt. Die verblindeten Präparate wurden anhand eines semiquantitativen Scoring-Systems (0 - 3; siehe Abschnitt 3.4.3) lichtmikroskopisch ausgewertet. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus n unabhängigen Proben dargestellt. **p < 0,01 gegenüber Kontrollen; ##p < 0,01 gegenüber der Gruppe mit der niedrigeren Dosis des jeweiligen Zeitpunktes (Mann-Whitney-Test)

4.2.4 Immunhistochemie

4.2.4.1 Markerproteine für Pankreatische Sternzellen

Untersucht wurde die Expression von α -SMA und Desmin.

Um die Anzahl Desmin-positiver Zellen (Abb. 4.11) zu den verschiedenen Zeitpunkten bestimmen zu können, wurde dieser Marker an Kryostatschnitten mittels Immunhistochemie detektiert und lichtmikroskopisch durch Zellzählung ausgewertet.

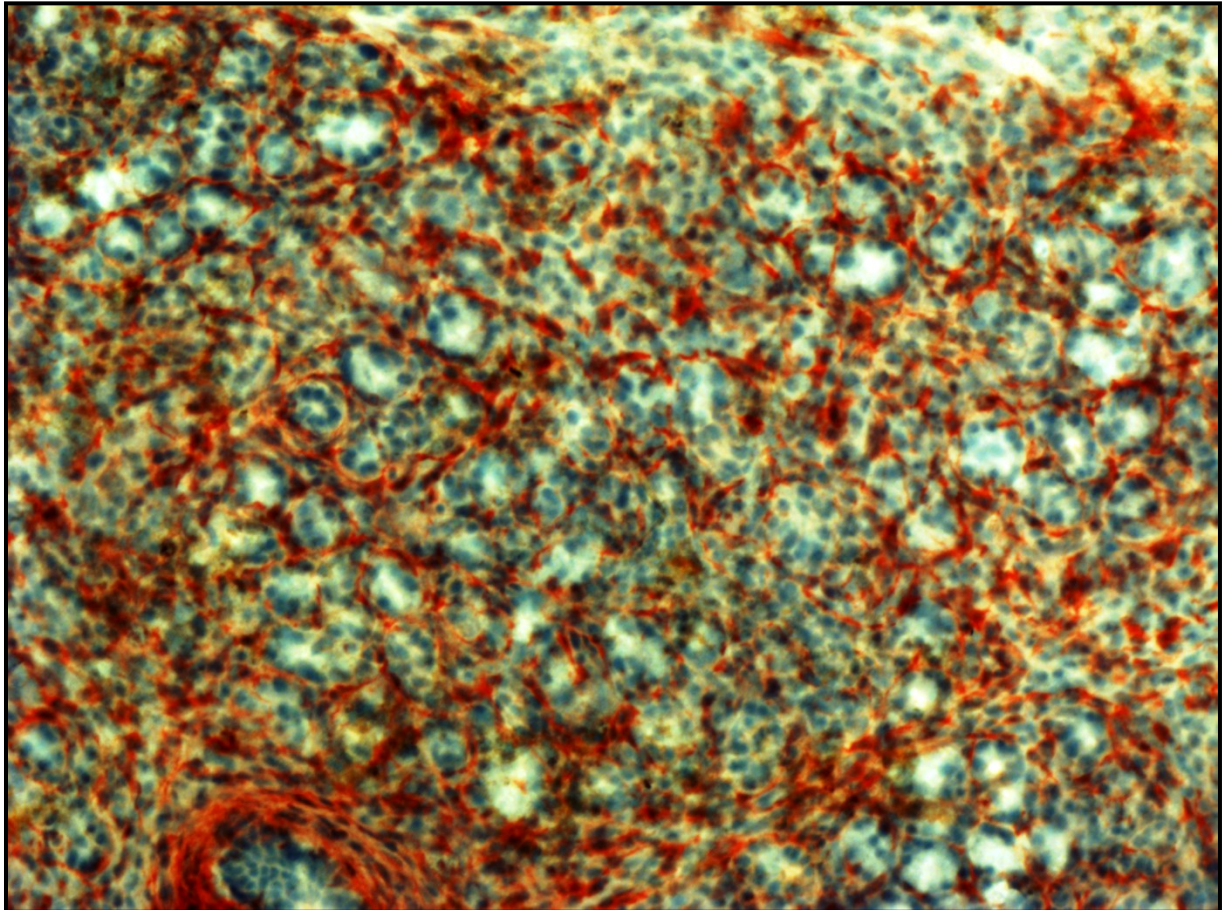


Abbildung 4.11: Desmin-positive Zellen bei einer Ratte mit DBTC-Pankreatitis.

Das Gewebe stammt von einer Ratte, welche 8 mg DBTC/kg KG erhielt und nach einer Woche getötet wurde. Nach Anfertigung von frischen Gefrierschnitten wurde mittels APAAP-Färbung Desmin angefärbt. Originalvergrößerung x100

Bereits in der Kontrollgruppe waren viele Desmin-positive Zellen vorhanden. Der Mittelwert lag bei 1936 ± 205 Zellen/mm² (Abb. 4.12, weiße Säule). In beiden Versuchsgruppen stieg die Anzahl der Zellen nach DBTC-Gabe in den statistisch hoch signifikanten Bereich. Die Maxima wurden nach 1 - 2 Wochen erreicht. Die 6 mg-Gruppe (hellgraue Säulen) zeigte im Verlauf einen rasch abfallenden Wert, der sich nach 8 Wochen bereits dem der Kontrollgruppe näherte. In der 8 mg-Gruppe (dunkelgraue Säulen) fanden sich durchgängig höhere Anzahlen. Im Verlauf nahm die Zellzahl zunächst langsamer ab, so dass der Unterschied zwischen den Gruppen nach 4 Wochen signifikant wurde.

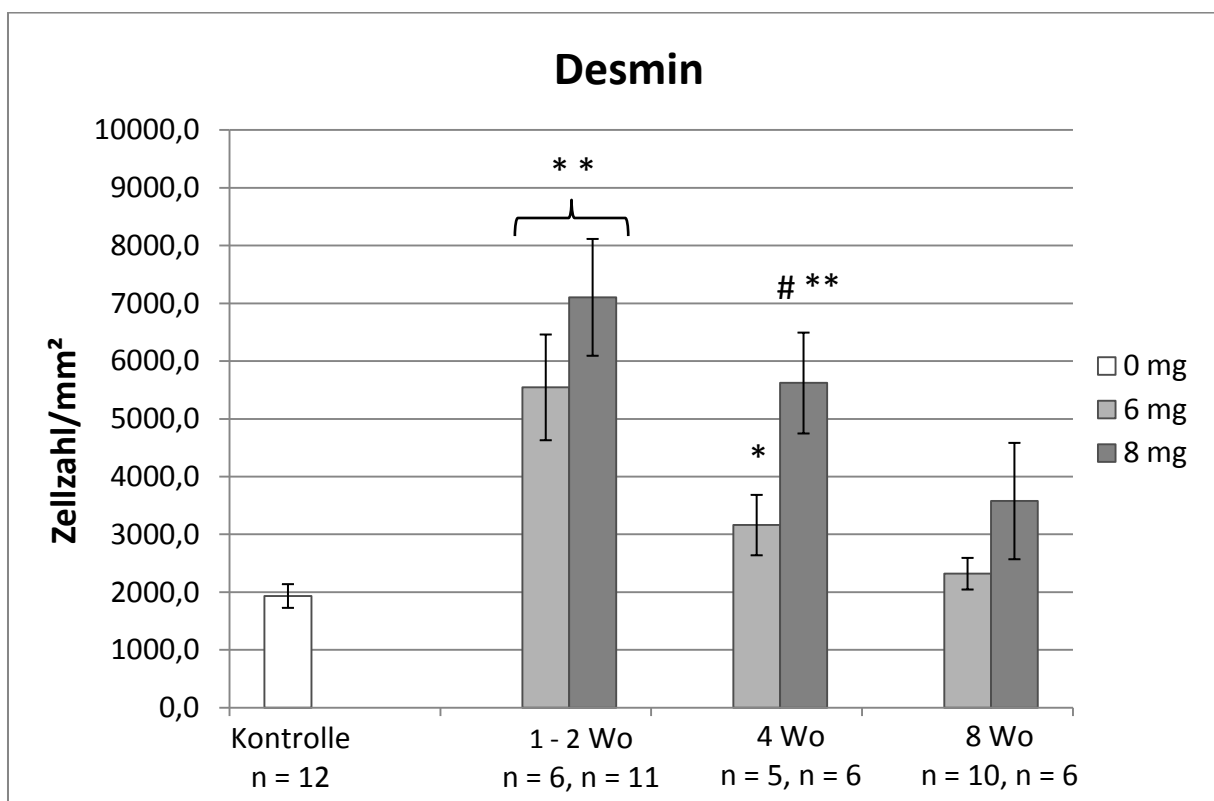


Abbildung 4.12: Infiltration von Desmin-positiven Zellen im Pankreasgewebe.

Junge gesunde Ratten erhielten 6 bzw. 8 mg DBTC/kg KG als einmalige intravenöse Injektion. Es entwickelte sich dosisabhängig eine Pankreatitis unterschiedlicher Stärke. Die Tiere wurden nach 1, 2, 4 oder 8 Wochen getötet und die Pankreata entnommen. Anschließend wurde Desmin angefärbt. Die verblindeten Präparate wurden am Lichtmikroskop ausgezählt, wie im Methodenteil beschrieben. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus n unabhängigen Proben dargestellt. *p < 0,05 und **p < 0,01 gegenüber Kontrollen; #p < 0,05 gegenüber der Gruppe mit der niedrigeren Dosis des jeweiligen Zeitpunktes (Mann-Whitney-Test)

α -SMA exprimierende Zellen wurden an Kryostatschnitten mittels Immunhistochemie angefärbt und mit Hilfe eines Scores (0 - 3, siehe Abschnitt 3.4.2.3) lichtmikroskopisch ausgewertet. Ein Beispiel zeigt Abbildung 4.13.

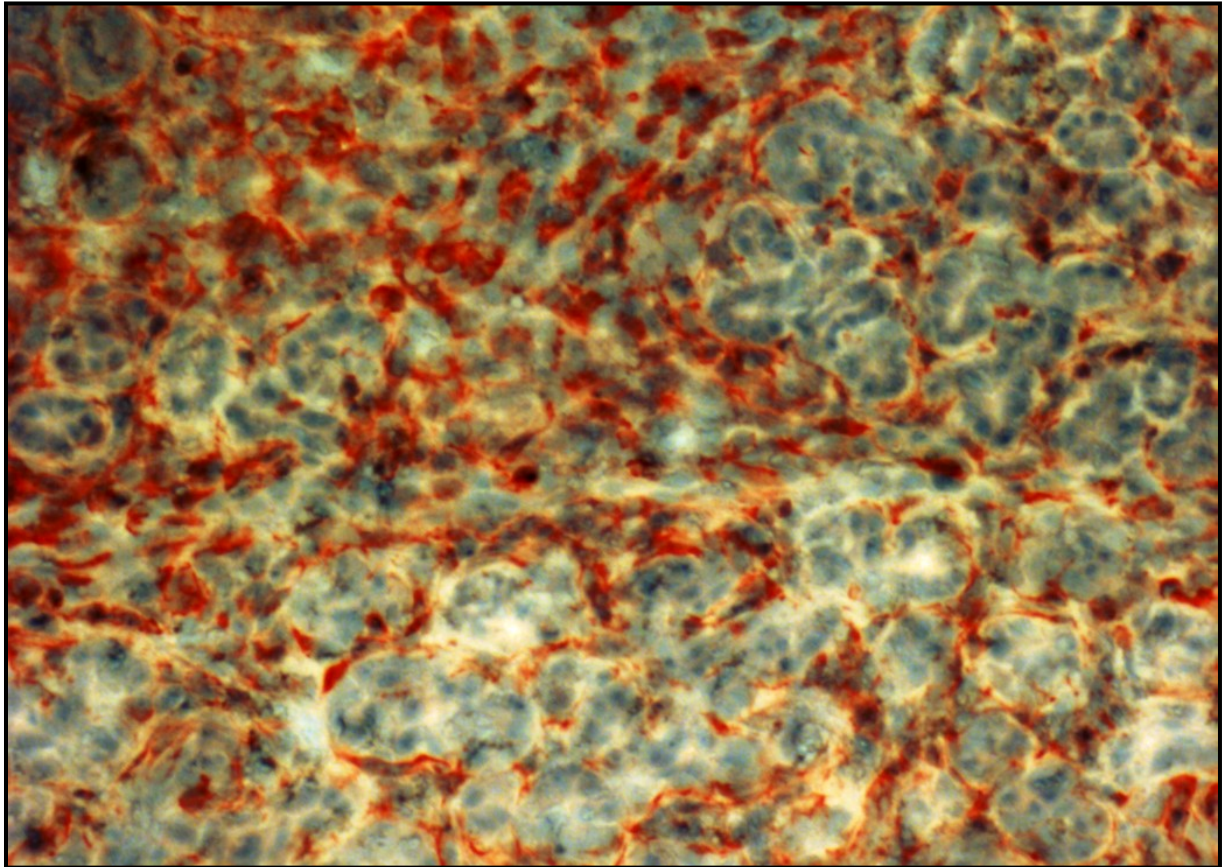


Abbildung 4.13: α -SMA-positive Zellen bei einer Ratte mit DBTC-Pankreatitis.

Das Gewebe stammt von einer Ratte, welche 8 mg DBTC/kg KG erhielt und nach einer Woche getötet wurde. Nach Anfertigung von frischen Gefrierschnitten wurde mittels APAAP-Färbung α -SMA angefärbt. Originalvergrößerung x100

Die Resultate sind in Abbildung 4.14 dargestellt. Unter den Kontrollen befanden sich nur vereinzelt für α -SMA-positive Zellen (Abb. 4.14, weiße Säule). Entsprechend lag der durchschnittliche Score bei $0,25 \pm 0,13$. Nach Gabe von 6 mg DBTC/kg KG stieg die Zahl im nicht signifikanten Bereich an (hellgraue Säulen). Das Maximum entwickelte sich nach 1 - 2 Wochen, während nach 8 Wochen das Niveau der Kontrollen bereits wieder erreicht wurde. Dagegen stieg der Wert nach Applikation von 8 mg DBTC/kg KG in den hoch signifikanten Bereich und erreichte erst nach 4 Wochen sein Maximum (dunkelgraue Säulen). 8 Wochen nach der DBTC-Gabe war die Anzahl α -SMA tragender Zellen gegenüber der Kontrollgruppe noch immer erhöht, allerdings nicht in statistisch signifikantem Ausmaß.

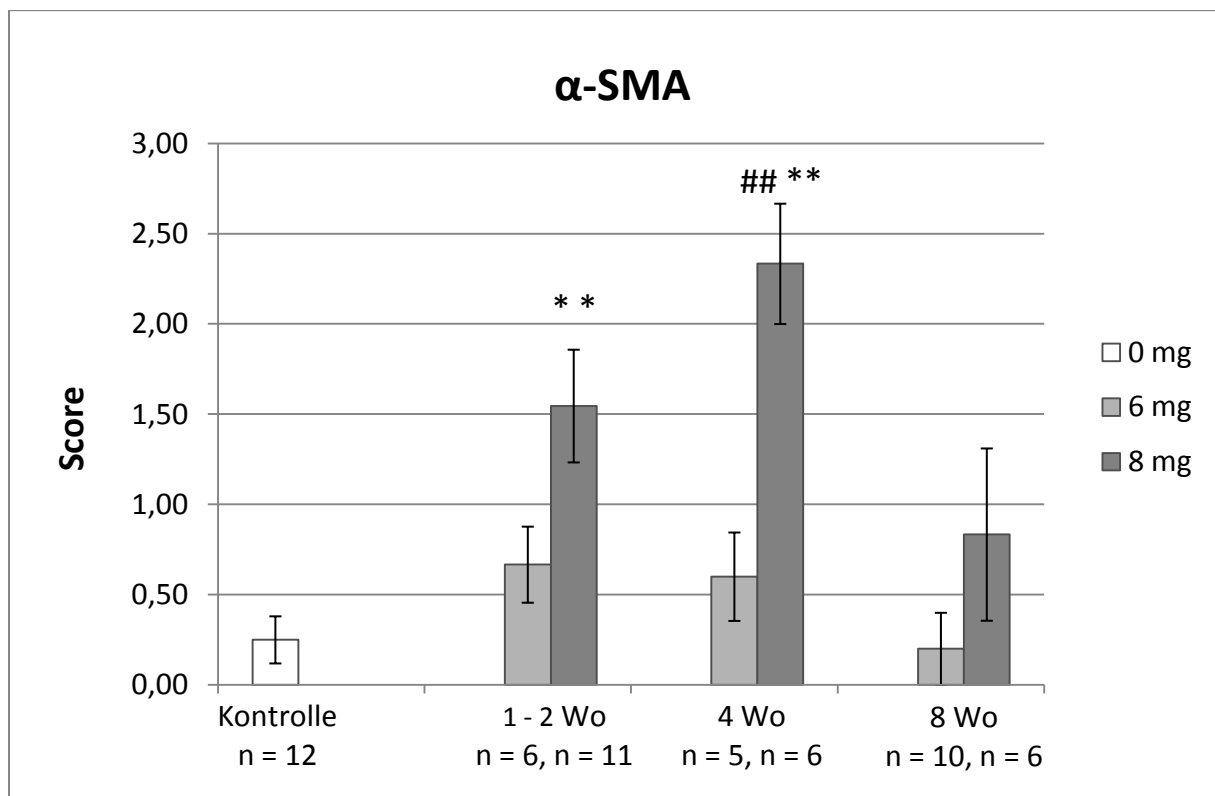


Abbildung 4.14: Quantifizierung von α -SMA-positiven Zellen bei Ratten mit DBTC-Pankreatitis.

Junge gesunde Ratten erhielten 6 bzw. 8 mg DBTC/kg KG als einmalige intravenöse Injektion. Es entwickelte sich dosisabhängig eine Pankreatitis unterschiedlicher Stärke. Die Tiere wurden nach 1, 2, 4 oder 8 Wochen getötet und die Pankreata entnommen. Anschließend wurde α -SMA angefärbt. Die verblindeten Präparate wurden anhand eines semiquantitativen Scoring-Systems (0 - 3; siehe Abschnitt 3.4.2) lichtmikroskopisch ausgewertet. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus n unabhängigen Proben dargestellt. **p < 0,01 gegenüber Kontrollen; ## p < 0,01 gegenüber der Gruppe mit der niedrigeren Dosis des jeweiligen Zeitpunktes (Mann-Whitney-Test)

4.2.4.2 Ki67 (Proliferierende Zellen)

Um Ki67-positive Zellen bestimmen zu können, wurde ein entsprechender Primärantikörper genutzt. Ansonsten wurde vorgegangen, wie für Desmin beschrieben. Ein Beispiel für Ki67-positive Zellen im Gewebe einer an DBTC-Pankreatitis erkrankten Ratte ist in Abbildung 4.15 dargestellt.

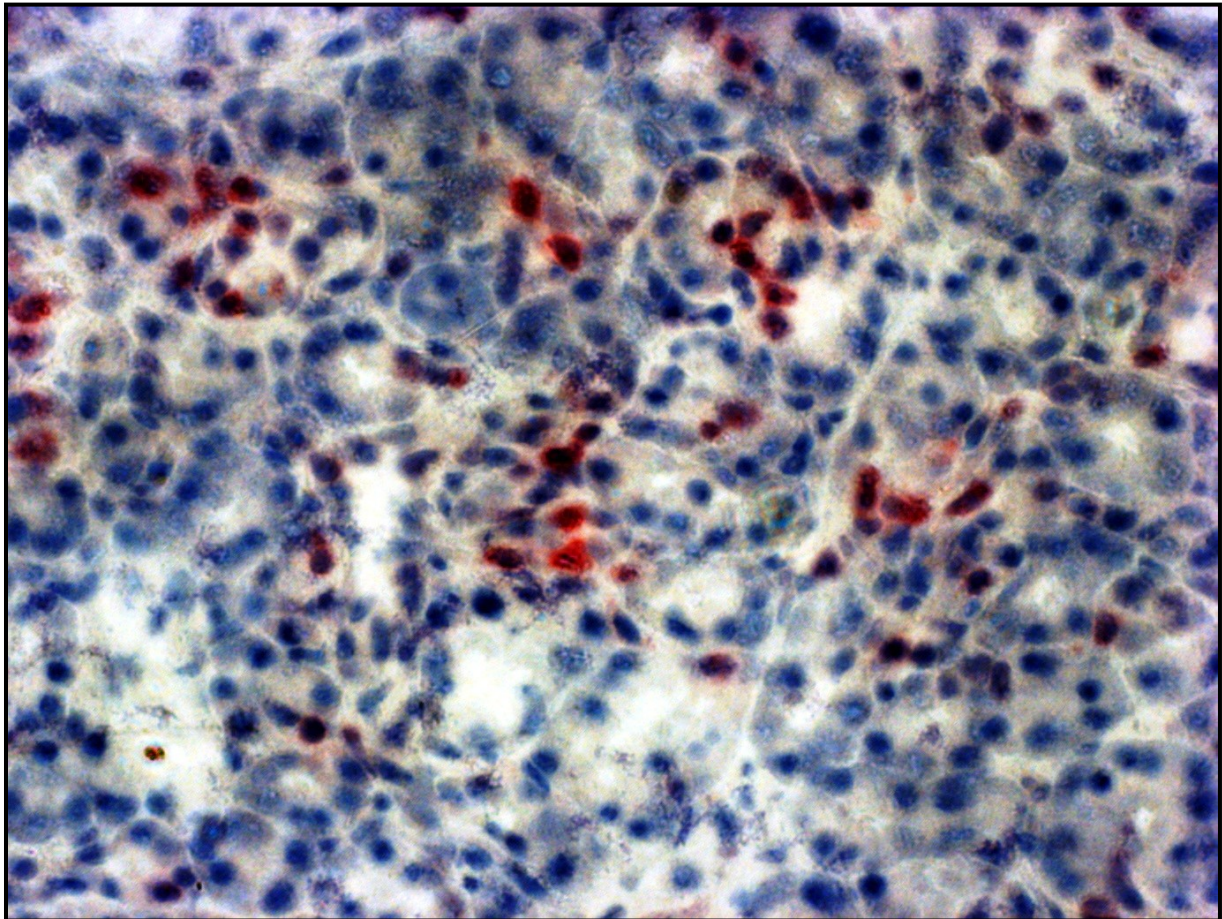


Abbildung 4.15: Ki67-positive Zellen bei einer Ratte mit DBTC-Pankreatitis.

Das Gewebe stammt von einer Ratte, welche 8 mg DBTC/kg KG erhielt und nach einer Woche getötet wurde. Nach Anfertigung von frischen Gefrierschnitten wurde mittels APAAP-Färbung Ki67 angefärbt. Originalvergrößerung x200

Es befanden sich im Durchschnitt 244 ± 73 Zellen/mm² im gesunden Gewebe (Abb. 4.16, weiße Säule). Die Applikation von 6 mg DBTC/kg KG führte zu einem hoch signifikanten Anstieg Ki67-positiver Zellen gegenüber der Kontrollgruppe nach 1 - 2 Wochen (hellgraue Säulen). Der Verlauf zeigte eine zügige Abnahme der Werte bis auf das Kontrollniveau nach 8 Wochen. Nach der Gabe von 8 mg DBTC/kg KG war die Anzahl Ki67-positiver Zellen zum ersten Zeitpunkt nur wenig ausgeprägter als in der niedriger dosierten Gruppe (dunkelgraue Säulen). Dagegen gab es nur eine geringe Abnahmetendenz nach 4 Wochen, so dass der Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen signifikant wurde. Nach 8 Wochen fiel die Zellzahl stark ab.

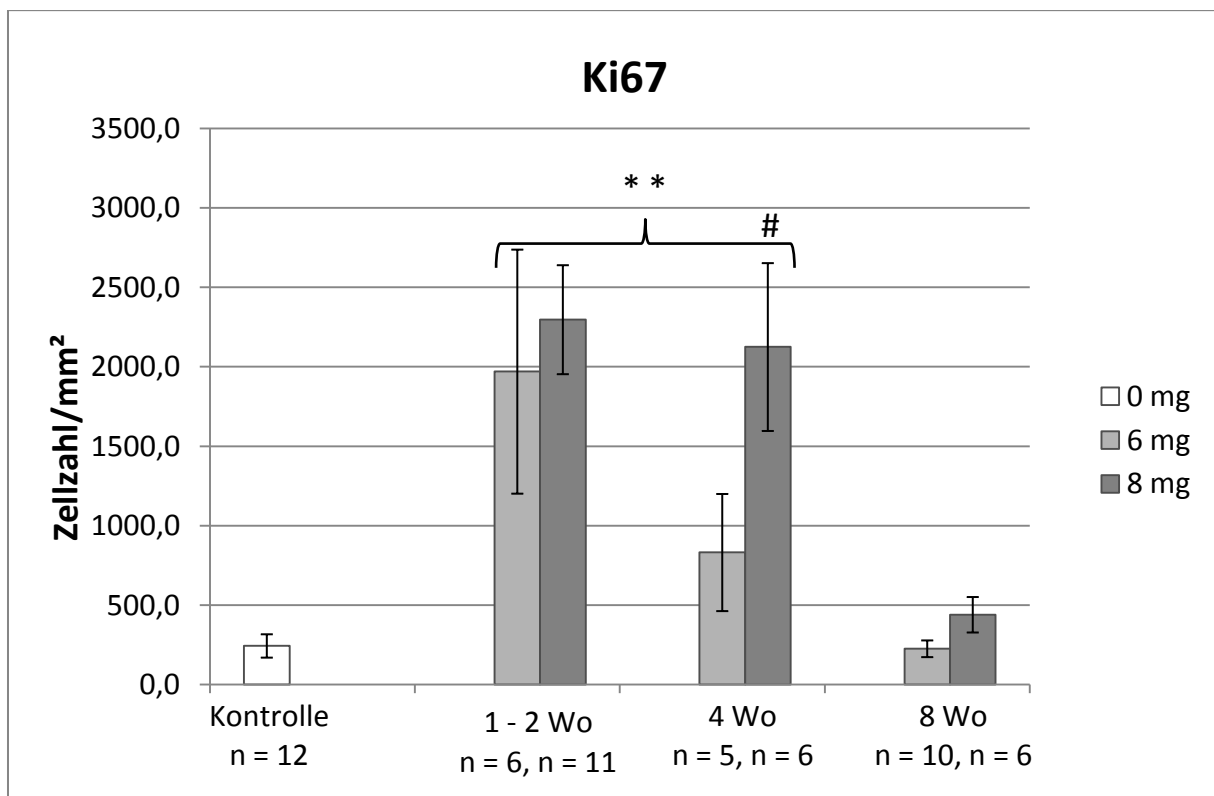


Abbildung 4.16: Infiltration von Ki67-positiven Zellen im Pankreasgewebe.

Junge gesunde Ratten erhielten 6 bzw. 8 mg DBTC/kg KG als einmalige intravenöse Injektion. Es entwickelte sich dosisabhängig eine Pankreatitis unterschiedlicher Stärke. Die Tiere wurden nach 1, 2, 4 oder 8 Wochen getötet und die Pankreata entnommen. Anschließend wurde Ki67 angefärbt. Die verblindeten Präparate wurden am Lichtmikroskop ausgezählt, wie im Methodenteil beschrieben. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus n unabhängigen Proben dargestellt. **p < 0,01 gegenüber Kontrollen; #p < 0,05 gegenüber der Gruppe mit der niedrigeren Dosis des jeweiligen Zeitpunktes (Mann-Whitney-Test)

4.2.4.3 CD161 (Natürliche Killerzellen)

Die Färbung und Auswertung für CD161-positive Zellen erfolgte, abgesehen vom eingesetzten Primärantikörper, wie für Desmin beschrieben. Abb. 4.17 zeigt ein Beispiel CD161-positiver Zellen im Gewebe einer an DBTC-Pankreatitis erkrankten Ratte.

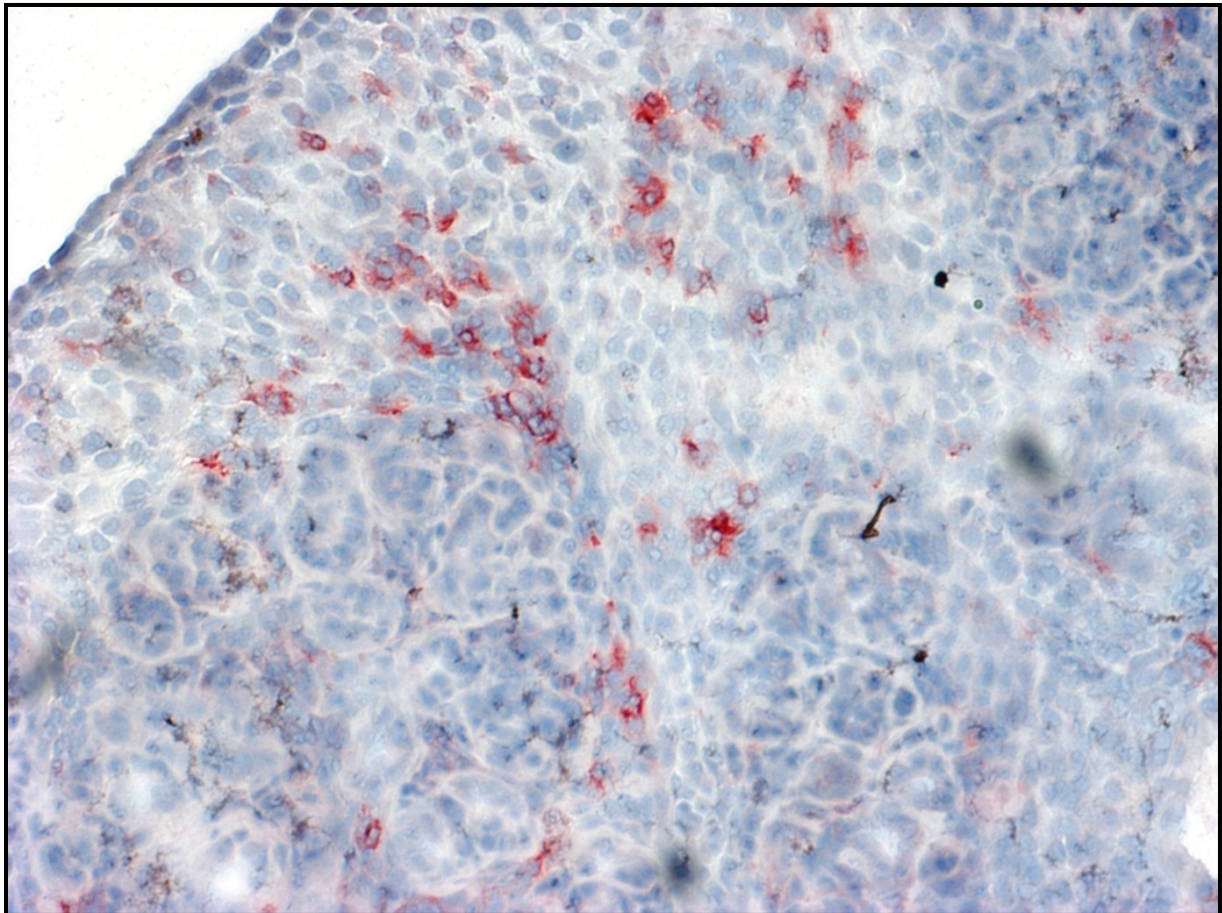


Abbildung 4.17: CD161-positive Zellen bei einer Ratte mit DBTC-Pankreatitis.

Das Gewebe stammt von einer Ratte, welche 8 mg DBTC/kg KG erhielt und nach einer Woche getötet wurde. Nach Anfertigung von frischen Gefrierschnitten wurde mittels APAAP-Färbung CD161 angefärbt. Originalvergrößerung x100

Vereinzelte fanden sich CD161-positive Zellen auch in der Kontrollgruppe (Abb. 4.18, weiße Säule). Nach Gabe von 6 mg DBTC/kg KG stieg die Anzahl in den hoch signifikanten Bereich und erreichte ihr Maximum nach 4 Wochen (hellgraue Säulen). Die Applikation von 8 mg DBTC/kg KG führte nach 1 - 2 Wochen zu einem sechsfachen Anstieg gegenüber der 6 mg-Gruppe (dunkelgraue Säulen). Anschließend fielen die Werte stark ab, so dass nach 8 Wochen beide Gruppen etwa auf gleichem Niveau, aber noch immer hoch signifikant über der Kontrollgruppe lagen.

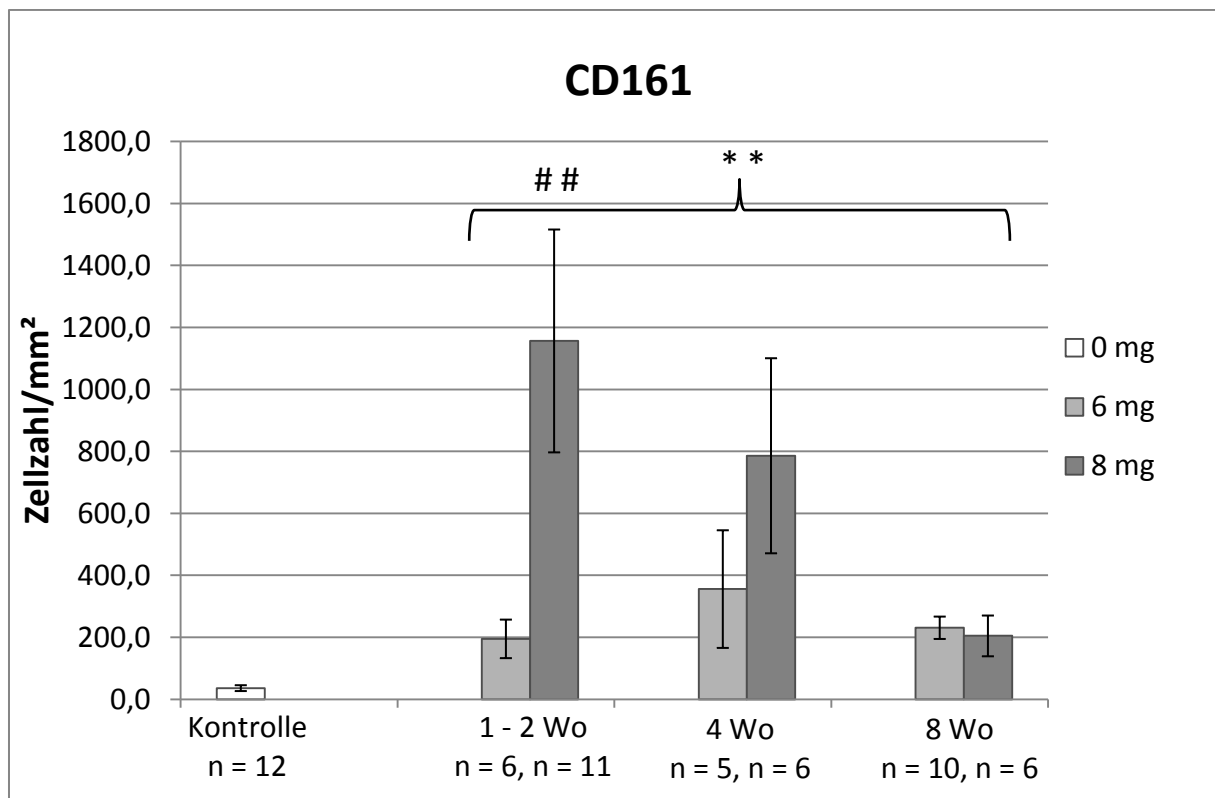


Abbildung 4.18: Infiltration von CD161-positiven Zellen im Pankreasgewebe.

Junge gesunde Ratten erhielten 6 bzw. 8 mg DBTC/kg KG als einmalige intravenöse Injektion. Es entwickelte sich dosisabhängig eine Pankreatitis unterschiedlicher Stärke. Die Tiere wurden nach 1, 2, 4 oder 8 Wochen getötet und die Pankreata entnommen. Anschließend wurde CD161 angefärbt. Die verblindeten Präparate wurden am Lichtmikroskop ausgezählt, wie im Methodenteil beschrieben. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus n unabhängigen Proben dargestellt. **p < 0,01 gegenüber Kontrollen; ##p < 0,01 gegenüber der Gruppe mit der niedrigeren Dosis des jeweiligen Zeitpunktes (Mann-Whitney-Test)

4.2.4.4 CD4 (T-Helferzellen)

CD4-positive Zellen wurden nach dem Protokoll der Desminfärbung angefärbt und ausgewertet, wobei anstelle von Anti-Desmin ein CD4-spezifischer Primärantikörper zum Einsatz kam. In Abbildung 4.19 ist Pankreasgewebe einer Ratte mit DBTC-Pankreatitis und CD4-positiven Zellen dargestellt.

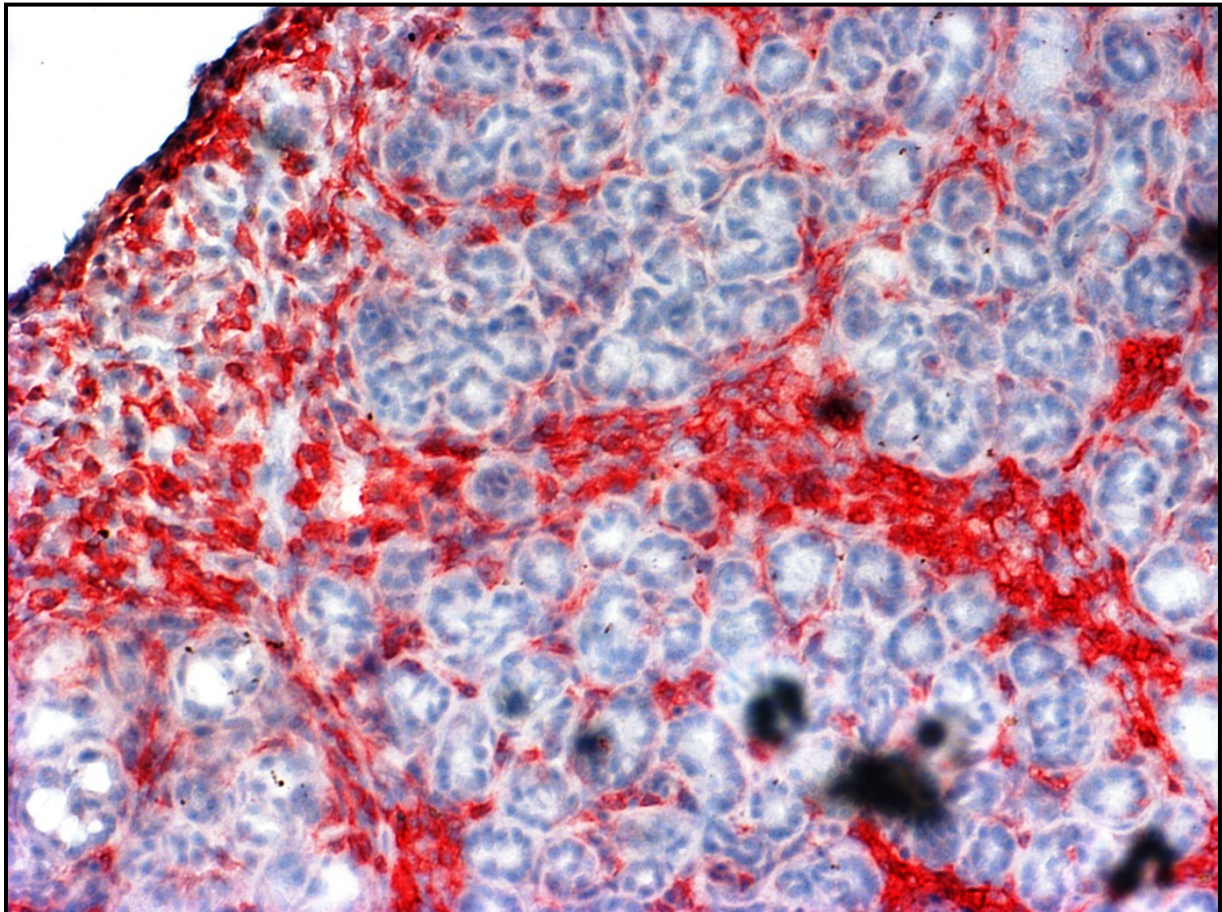


Abbildung 4.19: CD4-positive Zellen bei einer Ratte mit DBTC-Pankreatitis.

Das Gewebe stammt von einer Ratte, welche 8 mg DBTC/kg KG erhielt und nach einer Woche getötet wurde. Nach Anfertigung von frischen Gefrierschnitten wurde mittels APAAP-Färbung CD4 angefärbt. Originalvergrößerung x100

Die Kontrollgruppe zeigte bereits viele CD4-positive Zellen. Im Mittel befanden sich 966 ± 117 Zellen/mm² im Gewebe (Abb. 4.20, weiße Säule). In beiden Versuchsgruppen wurde das Maximum der CD4-Zellen 1 - 2 Wochen nach DBTC-Gabe erreicht. Im Verlauf zeigte sich eine Abnahme der Zellzahlen. Die niedriger dosierte Gruppe näherte sich nach 8 Wochen der Kontrollgruppe an (hellgraue Säule). Durchgehend höhere Werte erreichte die höher dosierte Versuchsgruppe (dunkelgraue Säulen). Nach 4 Wochen war dieser Unterschied auch statistisch signifikant.

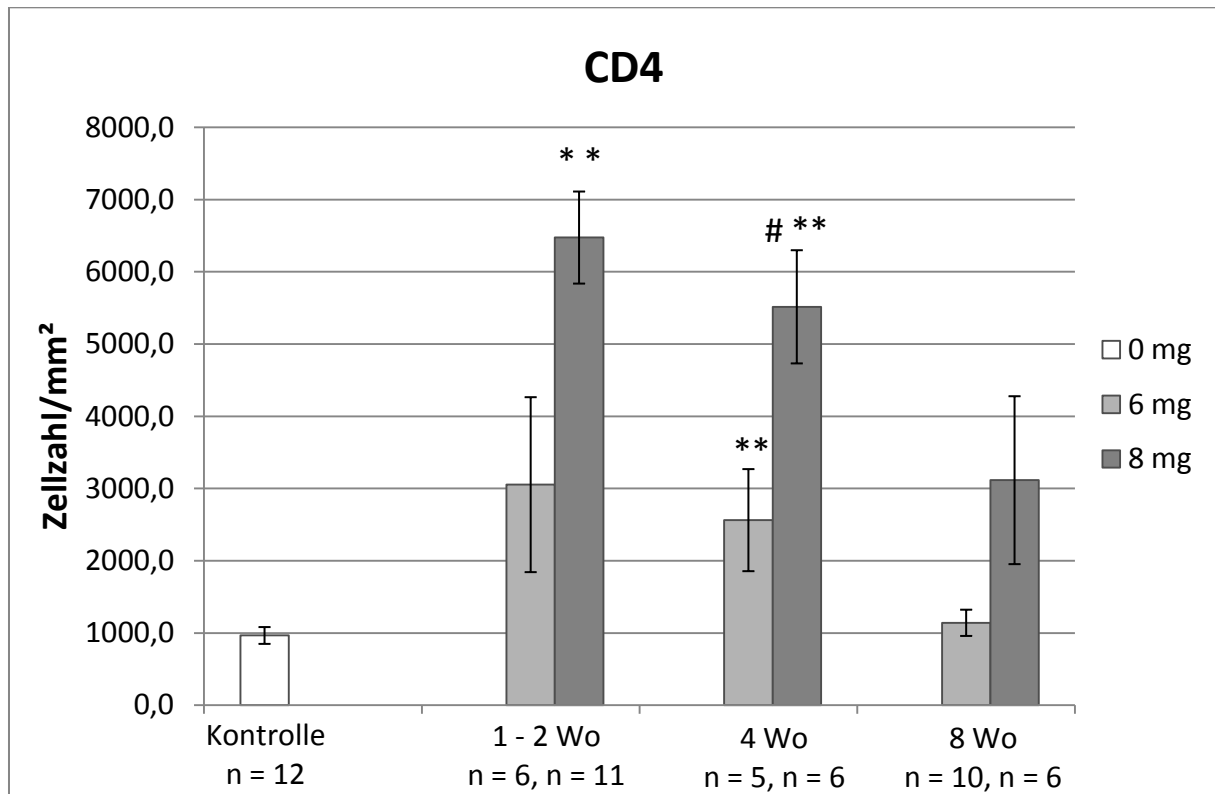


Abbildung 4.20: Infiltration von CD4-positiven Zellen im Pankreasgewebe.

Junge gesunde Ratten erhielten 6 bzw. 8 mg DBTC/kg KG als einmalige intravenöse Injektion. Es entwickelte sich dosisabhängig eine Pankreatitis unterschiedlicher Stärke. Die Tiere wurden nach 1, 2, 4 oder 8 Wochen getötet und die Pankreata entnommen. Anschließend wurde CD4 angefärbt. Die verblindeten Präparate wurden am Lichtmikroskop ausgezählt, wie im Methodenteil beschrieben. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus n unabhängigen Proben dargestellt. **p < 0,01 gegenüber Kontrollen; #p < 0,05 gegenüber der Gruppe mit der niedrigeren Dosis des jeweiligen Zeitpunktes (Mann-Whitney-Test)

4.2.4.5 CD8a (Zytotoxische T-Zellen)

Die Anfärbung und Auswertung von CD8a-positiven Zellen erfolgte wie für Desmin beschrieben. Lediglich der genutzte Primärantikörper unterschied sich. Eine Beispielfärbung ist in Abbildung 4.21 dargestellt.

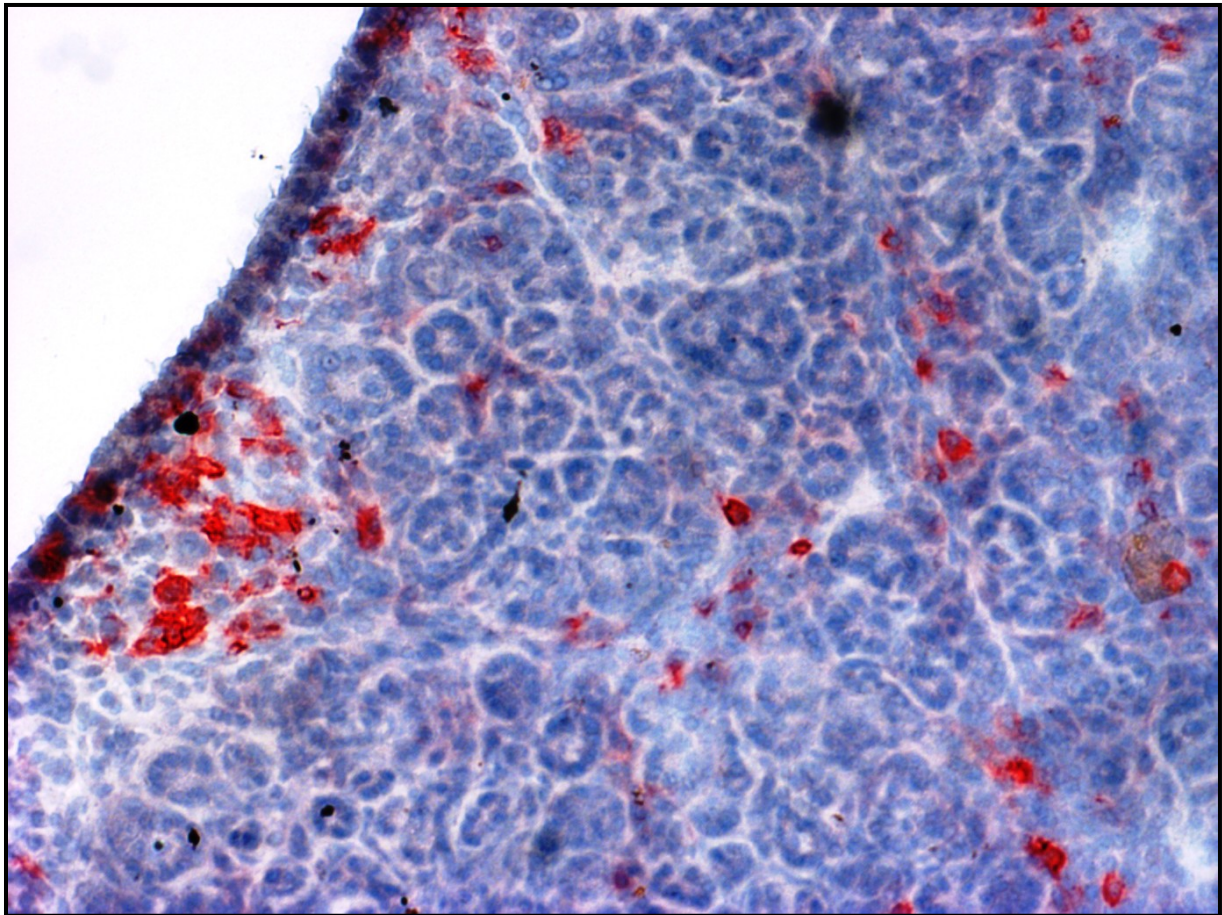


Abbildung 4.21: CD8a-positive Zellen bei einer Ratte mit DBTC-Pankreatitis.

Das Gewebe stammt von einer Ratte, welche 8 mg DBTC/kg KG erhielt und nach einer Woche getötet wurde. Nach Anfertigung von frischen Gefrierschnitten wurde mittels APAAP-Färbung CD8a angefärbt. Originalvergrößerung x100

In der Kontrollgruppe zeigten sich diese Zellen nur vereinzelt (Abb. 4.22, weiße Säule). Nach Gabe von 6 mg DBTC/kg KG stiegen die Zellzahlen an und erreichten ihr Maximum nach 4 Wochen (hellgraue Säulen). Die Applikation von 8 mg DBTC/kg KG führte zu einer sehr starken Zunahme CD8a-positiver Zellen (dunkelgraue Säulen). Das Maximum fand sich nach 1 - 2 Wochen und maß etwa das Zehnfache der niedriger dosierten Gruppe. Danach kam es zu einem Abfall, jedoch blieben die Zahlen weiter hoch signifikant über dem Kontrollniveau.

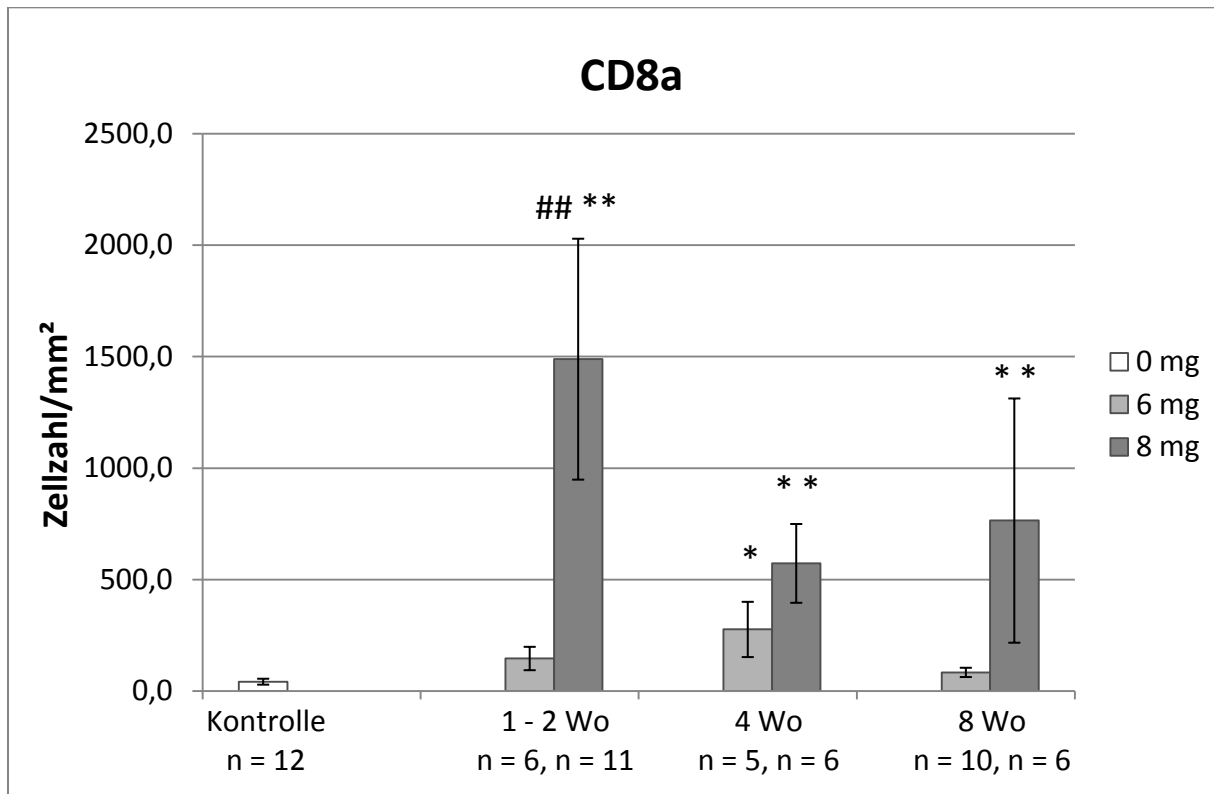


Abbildung 4.22: Infiltration von CD8a-positiven Zellen im Pankreasgewebe.

Junge gesunde Ratten erhielten 6 bzw. 8 mg DBTC/kg KG als einmalige intravenöse Injektion. Es entwickelte sich dosisabhängig eine Pankreatitis unterschiedlicher Stärke. Die Tiere wurden nach 1, 2, 4 oder 8 Wochen getötet und die Pankreata entnommen. Anschließend wurde CD8a angefärbt. Die verblindeten Präparate wurden am Lichtmikroskop ausgezählt, wie im Methodenteil beschrieben. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus n unabhängigen Proben dargestellt. *p < 0,05 und **p < 0,01 gegenüber Kontrollen; ***p < 0,01 gegenüber der Gruppe mit der niedrigeren Dosis des jeweiligen Zeitpunktes (Mann-Whitney-Test)

4.2.4.6 HIS36 (Makrophagen)

Die Bestimmung der HIS36-positiven Zellen erfolgte wie für Desmin beschrieben. Es kam lediglich ein anderer Primärantikörper zum Einsatz. Abbildung 4.23 zeigt ein Beispiel für HIS36-positive Zellen im Gewebe einer Ratte mit DBTC-Pankreatitis.

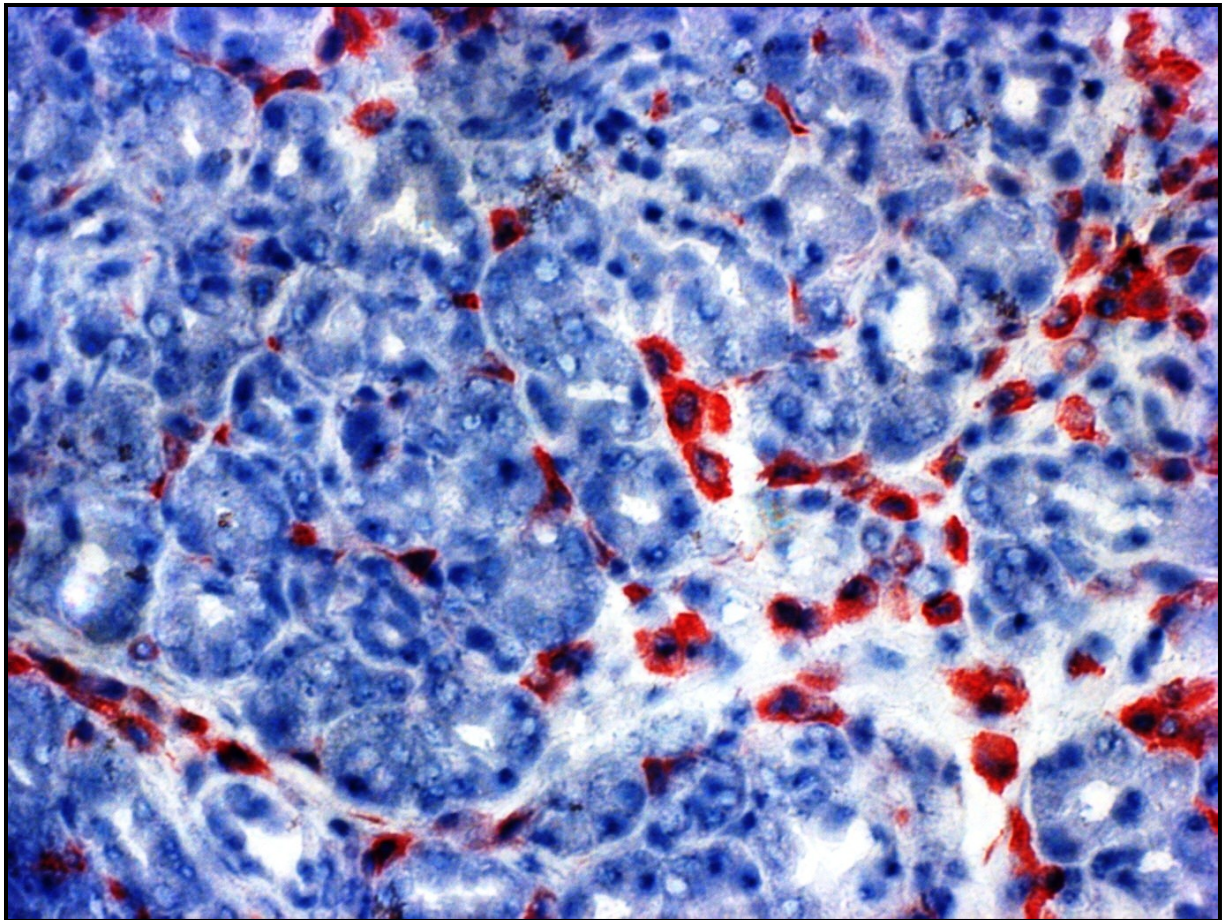


Abbildung 4.23: HIS36-positive Zellen bei einer Ratte mit DBTC-Pankreatitis.

Das Gewebe stammt von einer Ratte, welche 8 mg DBTC/kg KG erhielt und nach einer Woche getötet wurde. Nach Anfertigung von frischen Gefrierschnitten wurde mittels APAAP-Färbung HIS36 angefärbt. Originalvergrößerung x200

In der Kontrollgruppe wurden durchschnittlich 286 ± 57 Zellen/mm² gefunden (Abb. 4.24, weiße Säule). Nach einer Gabe von 6 mg DBTC/kg KG stieg die Zellzahl nach 1 - 2 Wochen an und zeigte im Verlauf nur eine minimale Abnahmetendenz (hellgraue Säulen). Vermutlich basierend auf einer deutlich geringeren Streubreite, ergab die Statistik nach 4 bzw. 8 Wochen eine hohe Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dagegen stieg der Wert in der 8 mg-Gruppe (dunkelgraue Säulen) nach 1 - 2 Wochen viel stärker, so dass der Unterschied zur 6 mg-Gruppe hoch signifikant wurde, und fiel im Verlauf dann stark ab. Dadurch näherten sich die Werte der beiden Versuchsgruppen nach 8 Wochen an.

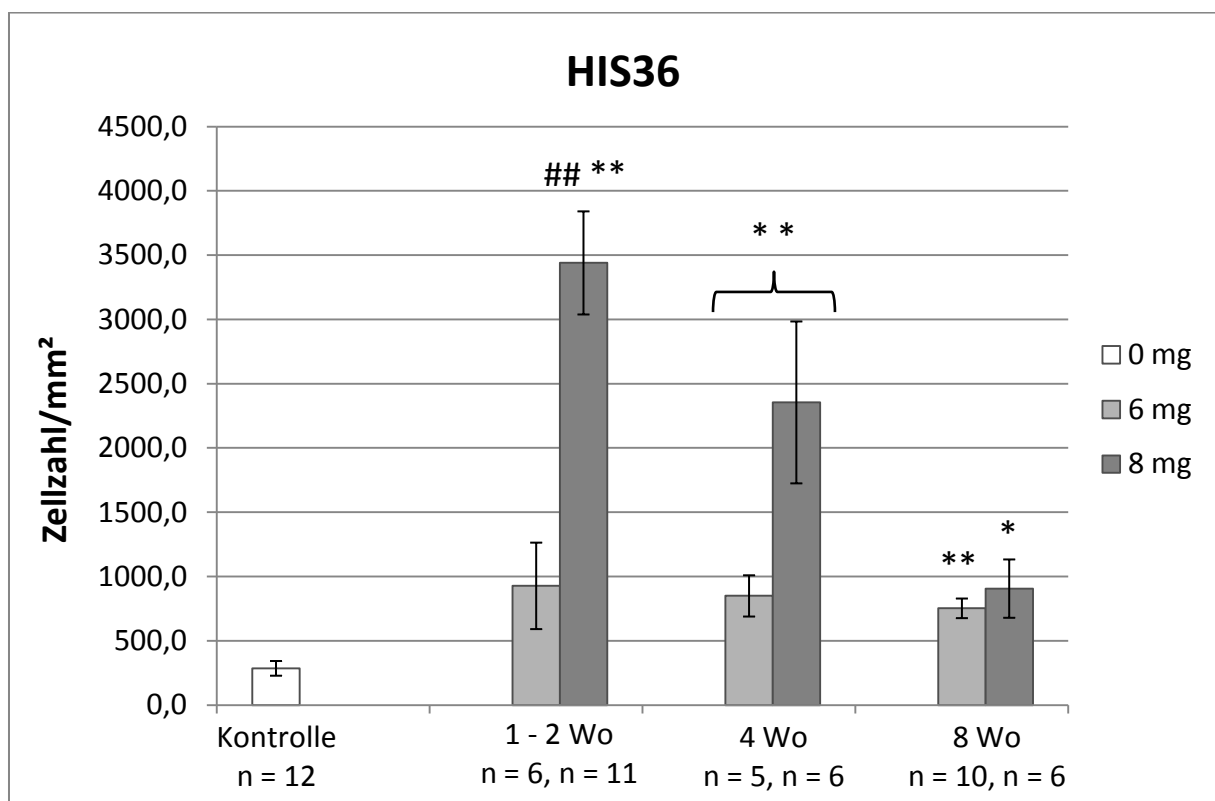


Abbildung 4.24: Infiltration von HIS36-positiven Zellen im Pankreasgewebe.

Junge gesunde Ratten erhielten 6 bzw. 8 mg DBTC/kg KG als einmalige intravenöse Injektion. Es entwickelte sich dosisabhängig eine Pankreatitis unterschiedlicher Stärke. Die Tiere wurden nach 1, 2, 4 oder 8 Wochen getötet und die Pankreata entnommen. Anschließend wurde HIS36 angefärbt. Die verblindeten Präparate wurden am Lichtmikroskop ausgezählt, wie im Methodenteil beschrieben. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus n unabhängigen Proben dargestellt. *p < 0,05 und **p < 0,01 gegenüber Kontrollen; ##p < 0,01 gegenüber der Gruppe mit der niedrigeren Dosis des jeweiligen Zeitpunktes (Mann-Whitney-Test)

4.2.4.7 RK-4 (Granulozyten)

Zur Bestimmung der RK-4-positiven Zellen wurde vorgegangen, wie bei Desmin beschrieben. Der Primärantikörper wurde entsprechend angepasst. Die Abbildung 4.25 zeigt RK-4-positive Zellen im Pankreasgewebe eines erkrankten Tieres.

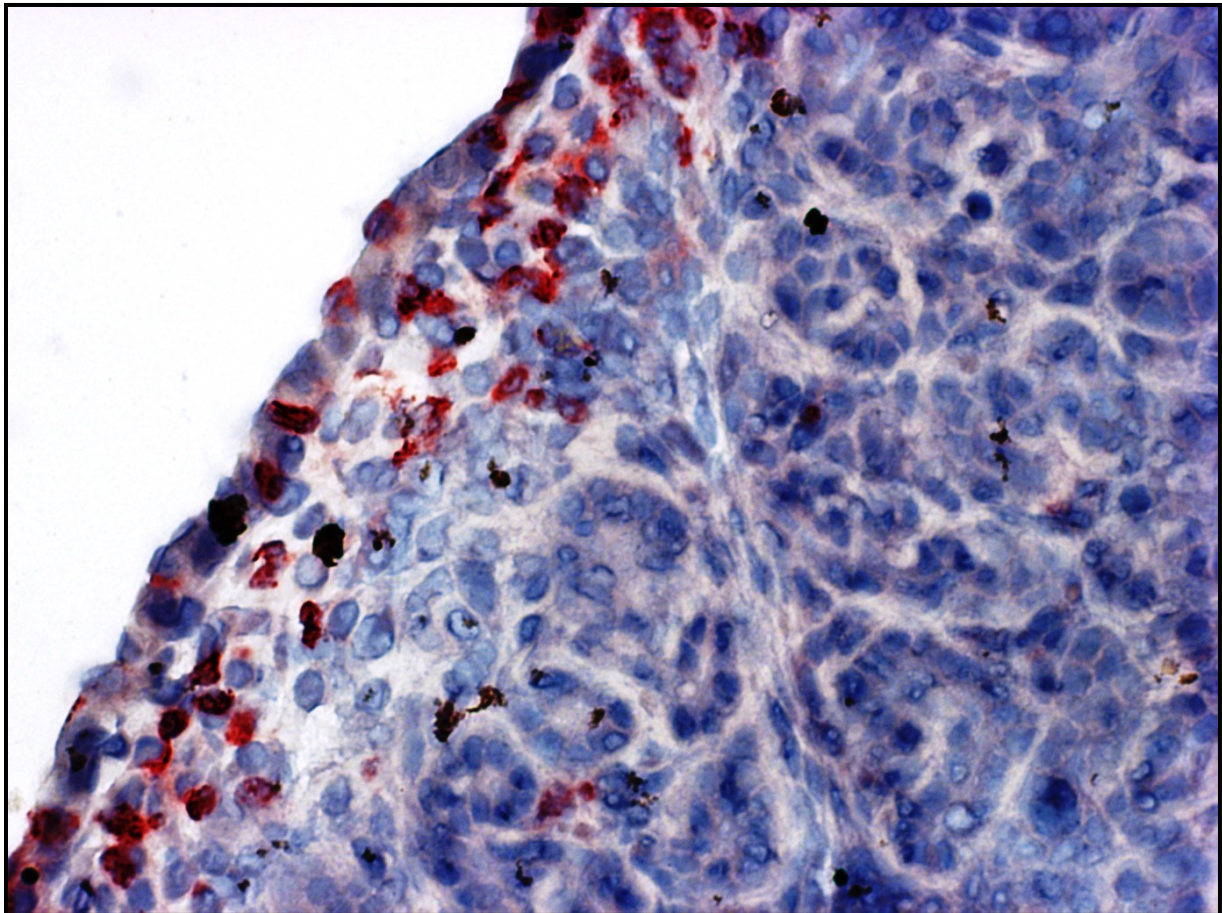


Abbildung 4.25: RK-4-positive Zellen bei einer Ratte mit DBTC-Pankreatitis.

Das Gewebe stammt von einer Ratte, welche 8 mg DBTC/kg KG erhielt und nach einer Woche getötet wurde. Nach Anfertigung von frischen Gefrierschnitten wurde mittels APAAP-Färbung RK-4 ange-färbt. Originalvergrößerung x200

Die Kontrollen zeigten im Durchschnitt 95 ± 33 Zellen/mm² (Abb. 4.26, weiße Säule). In beiden Versuchsgruppen stieg die Zellinfiltration nach 1 - 2 Wochen in den hoch signifikanten Bereich und nahm im Verlauf stark ab. Die niedriger dosierte Gruppe (hellgraue Säulen) glich sich nach 8 Wochen etwa dem Kontrollniveau an, während sich die Zellzahl in der höher dosierten Gruppe (dunkelgraue Säulen) auch nach dieser Zeit noch hoch signifikant über dem Kontrollniveau befand. Zu allen Zeitpunkten lagen die Werte der 8 mg-Gruppe über denen der 6 mg-Gruppe. Statistisch signifikant war dieser Unterschied nach 1 - 2 Wochen, nach 8 Wochen hoch signifikant.

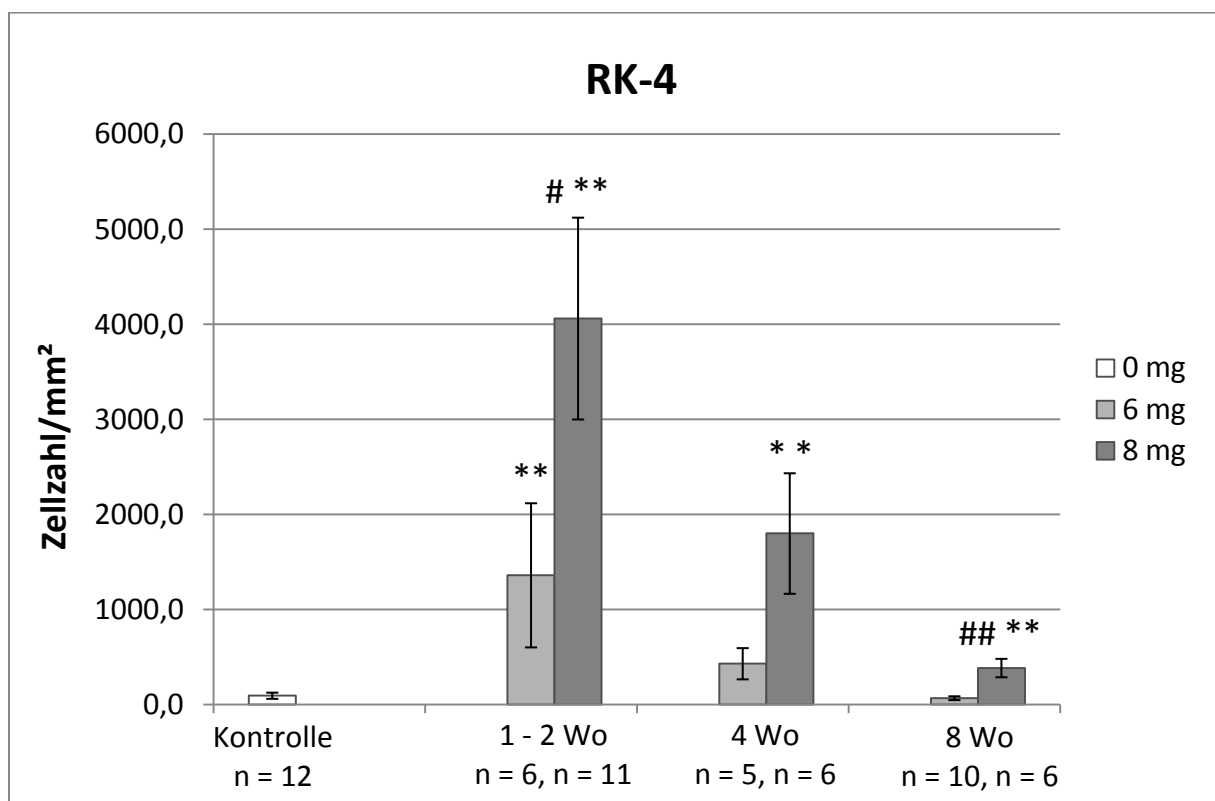


Abbildung 4.26: Infiltration von RK-4-positiven Zellen im Pankreasgewebe.

Junge gesunde Ratten erhielten 6 bzw. 8 mg DBTC/kg KG als einmalige intravenöse Injektion. Es entwickelte sich dosisabhängig eine Pankreatitis unterschiedlicher Stärke. Die Tiere wurden nach 1, 2, 4 oder 8 Wochen getötet und die Pankreata entnommen. Anschließend wurde RK-4 angefärbt. Die verblindeten Präparate wurden am Lichtmikroskop ausgezählt, wie im Methodenteil beschrieben. Es sind die Mittelwerte \pm SEM aus n unabhängigen Proben dargestellt. **p < 0,01 gegenüber Kontrollen; #p < 0,05 und ##p < 0,01 gegenüber der Gruppe mit der niedrigeren Dosis des jeweiligen Zeitpunktes (Mann-Whitney-Test)

4.2.5 Kolokalisation

In Abbildung 4.27 ist jeweils eine SA- β -Gal- (A), eine α -SMA- (B) und eine CD4-Färbung (C) dargestellt. Da alle Gewebeschnitte vom jeweils selben Tier stammen, sind alle Marker zum jeweils selben Zeitpunkt vorhanden. Die Schnitte wurden in Serie angefertigt, so dass eine hohe räumliche Nähe gegeben ist. Die Bilder zeigen eine deutliche Kolokalisation der genannten Marker im vom DBTC geschädigten Pankreas der Ratte.

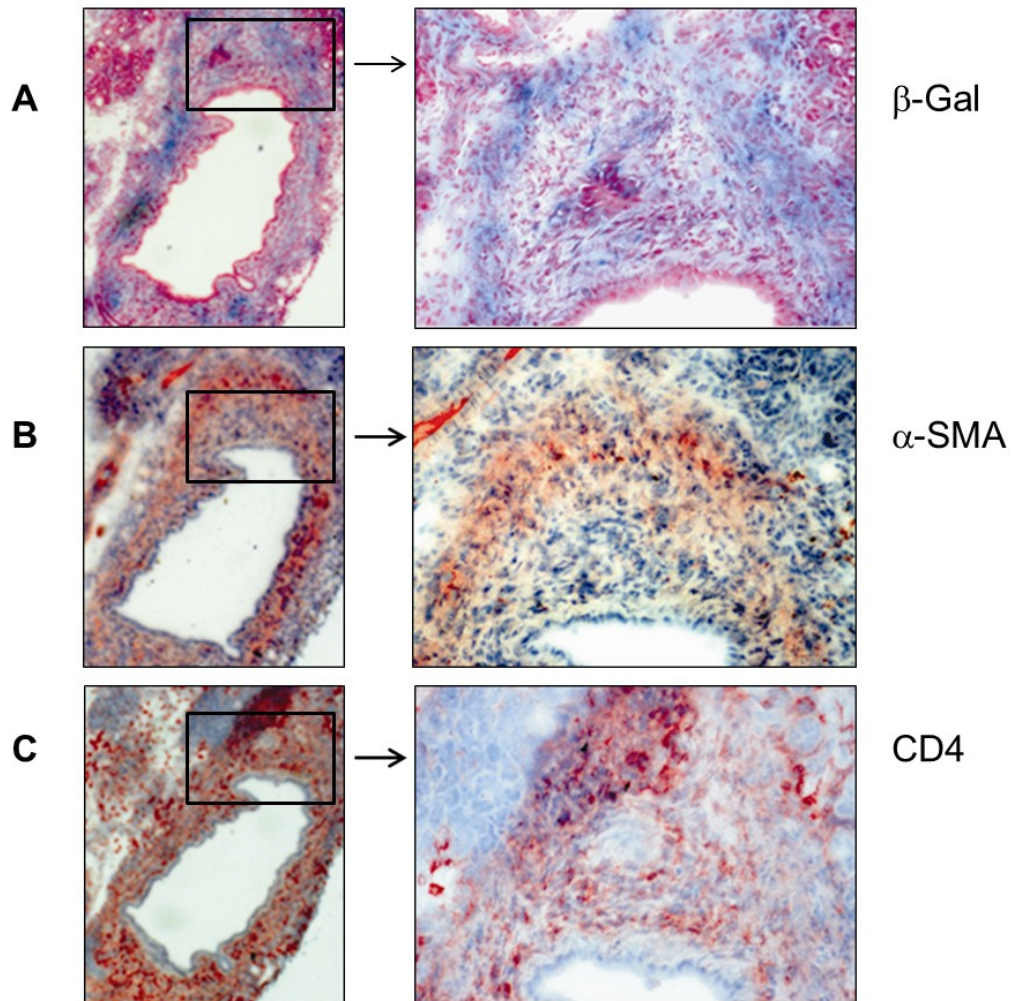


Abbildung 4.27: Kolokalisation von SA- β -Gal-, α -SMA- und CD4-Anfärbung bei Ratten mit DBTC-Pankreatitis.

Das Gewebe stammt von einer Ratte, welche 8 mg DBTC/kg KG erhielt und nach zwei Wochen getötet wurde. Nach Anfertigung von frischen Gefrierschnitten wurde SA- β -Gal (A) bzw. mittels APAAP-Färbung α -SMA (B) und CD4 (C) angefärbt. Die Bilder zeigen eine zeitliche und räumliche Nähe zwischen den blau gefärbten SA- β -Gal-positiven und den rot gefärbten α -SMA- und CD4-positiven Arealen. Originalvergrößerung links x25, rechts x100

4.3 NK-Zelldepletion bei DBTC-Pankreatitis

Im Folgenden werden die Ergebnisse der NK-Zelldepletion beschrieben. Es wurden zwei Gruppen von Ratten verglichen. Die Tiere, welche der NK-Zelldepletion unterzogen wurden (nachfolgend Depletionsgruppe), bekamen im Abstand von je 3 Tagen fünf intraperitoneale Injektionen von CD161-AK (100 µg pro Injektion) verabreicht. Anschließend erfolgte die Gabe von 6 mg DBTC/kg KG zur Induktion einer Pankreatitis. Zur Aufrechterhaltung der Depletion wurden die Injektionen der CD161-AK wöchentlich weitergeführt. Die Kontrollgruppe, welche der Depletionsgruppe gegenübergestellt wurde, bestand aus zwölf weiteren Ratten. Sieben Tiere davon bekamen statt CD161-AK Intratect als unspezifisches Antiserum injiziert, weitere fünf Tiere wurden ohne zusätzliche Antiserumgabe in die Kontrollgruppe aufgenommen. Auch diese Ratten bekamen eine einmalige Dosis von 6 mg DBTC/kg KG zur Pankreatitisinduktion injiziert.

Alle Tiere wurden dann nach 4 Wochen getötet, die Pankreata entnommen und Gewebeschnitte angefertigt. Durch die im Methodenteil für die DBTC-Pankreatitis beschriebenen Färbungen wurden verschiedene Zellen immunhistochemisch mittels entsprechender Zellmarker nachgewiesen.

Zur Kontrolle der Depletionserfolge wurden CD161-positive Zellen im Blut und im Gewebe nachgewiesen. Der Nachweis im Blut erfolgte durch Mitglieder der Arbeitsgruppe mit Hilfe der FACS-Analyse. Während die Kontrollgruppe einen mittleren Prozentsatz von 3,14 % CD161-positiver Zellen aufwies, enthielt die Depletionsgruppe nur 0,06 % (jeweils nach Lyse der Erythrozyten) [Fitzner *et al.*, 2012]. Im Gewebe der Kontrollen wurden durchschnittlich 276 ± 81 CD161-positive Zellen/mm² gefunden. Die NK-Zelldepletion führte mit einer Abnahme auf 97 ± 50 Zellen/mm² zu einem signifikanten Ergebnis in der Depletionsgruppe (Abb. 4.28).

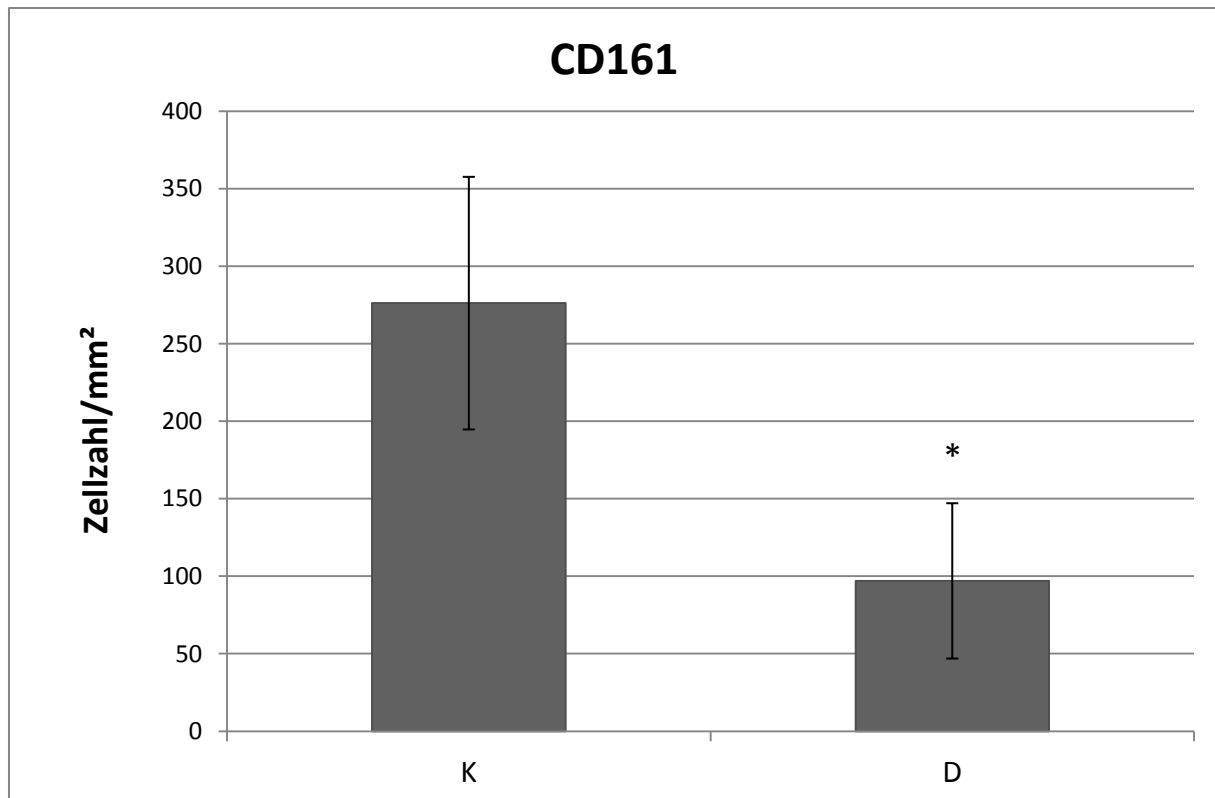


Abbildung 4.28: Infiltrate von CD161-positiven Zellen im Pankreas bei NK-Zelldepletion und DBTC-Pankreatitis.

Zur NK-Zelldepletion (D = Depletion) wurden gesunden jungen Ratten (n = 6) mehrfach AK gegen CD161 intraperitoneal injiziert. Die Tiere der Kontrollgruppe (K = Kontrolle) bekamen statt der CD161-AK entweder unspezifische IgG-AK (n = 7) injiziert oder blieben unbehandelt (n = 5). Zusätzlich erhielten alle Ratten einmalig 6 mg DBTC/kg KG in die Schwanzvene injiziert. Nach 4 Wochen wurden sie getötet und die Pankreata entnommen. Anschließend wurden die entsprechenden Färbungen CD161-positiver Zellen im Gewebe angefertigt und die verblindeten Präparate mit Hilfe eines Lichtmikroskops ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6 bzw. 12 unabhängigen Proben (Depletion bzw. Kontrolle). *p < 0,05 gegenüber Kontrollen (Mann-Whitney-Test)

In Abbildung 4.29 sind die Ergebnisse der HE-, α -SMA- und SA- β -Gal-Färbungen dargestellt. Die mittels HE-Färbungen nachgewiesene Entzündungsstärke und Fibrose der Kontrollgruppe ist vergleichbar mit den Ergebnissen zur DBTC-Pankreatitis von Ratten ohne zusätzliche Injektionen (siehe Abb. 4.6) und die NK-Zelldepletion führte hierbei zu keiner signifikanten Veränderung. Auch der Nachweis von aktivierten und seneszenten PSZ mittels der α -SMA- bzw. SA- β -Gal-Färbungen ähnelte den Ergebnissen der DBTC Serie (siehe Abb. 4.14 und 4.10). Es wurden ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und Depletionsgruppe gefunden. Diese Daten legen den Schluss nahe, dass die Depletion von CD161-positiven Zellen (NK-Zellen) keine wesentliche Veränderung für die Ausprägung der Pankreatitis sowie die Sternzellaktivierung und -seneszenz mit sich bringt.

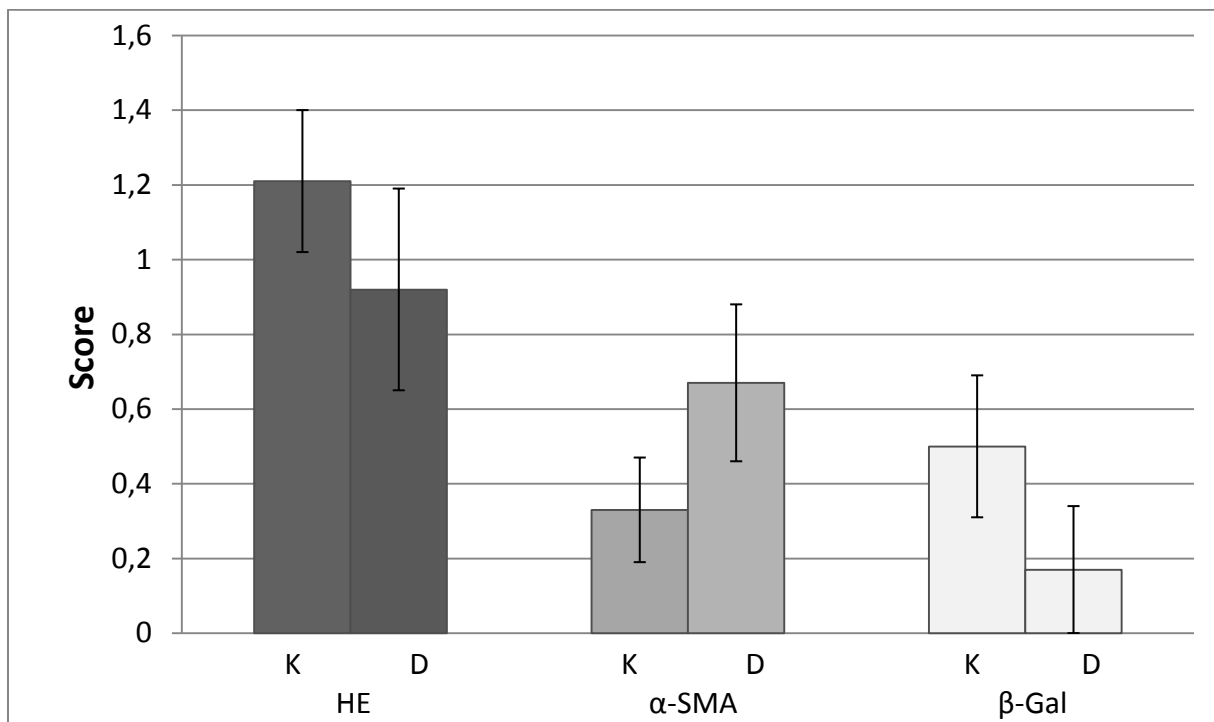


Abbildung 4.29: Histologische Befunde der DBTC-Pankreatitis von Ratten nach NK-Zelldepletion beurteilt an HE-Färbungen sowie durch Quantifizierung α -SMA- bzw. SA- β -Gal-positiver Zellen.

Zur NK-Zelldepletion (D = Depletion) wurden gesunden jungen Ratten (n = 6) mehrfach AK gegen CD161 intraperitoneal injiziert. Die Tiere der Kontrollgruppe (K = Kontrolle) bekamen statt der CD161-AK entweder unspezifische IgG-AK (n = 7) injiziert oder blieben unbehandelt (n = 5). Zusätzlich erhielten alle Ratten einmalig 6 mg DBTC/kg KG in die Schwanzvene injiziert. Nach 4 Wochen wurden sie getötet und die Pankreata entnommen. Anschließend wurden die entsprechenden Färbungen des Gewebes angefertigt und die verblindeten Präparate mit Hilfe der im Methodenteil beschriebenen Scoring-Systeme lichtmikroskopisch ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6 bzw. 12 unabhängigen Proben (Depletion bzw. Kontrolle). Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen K und D erreicht (Mann-Whitney-Test).

Die Infiltration mit CD4-positiven Zellen war in der Kontrollgruppe (also bei DBTC-behandelten Tieren) bereits sehr hoch. Dieses Ergebnis steht mit Literaturdaten in Einklang, die eine starke Entzündungsreaktion durch die DBTC-Gabe belegen [Sparmann *et al.*, 2001]. Die Depletionsgruppe zeigte nochmals eine Zunahme, welche jedoch nicht signifikant war. Die Auswertungen der IHC von CD4 sind in Abbildung 4.30 dargestellt.

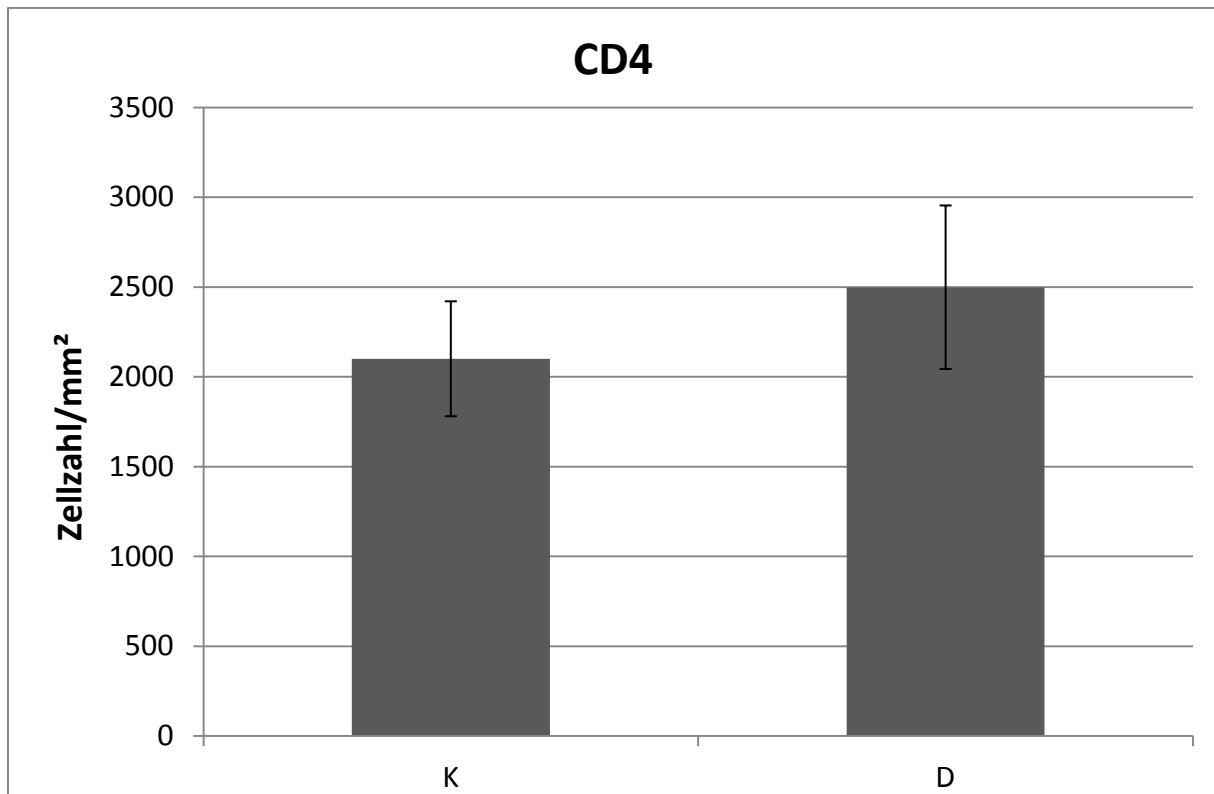


Abbildung 4.30: Infiltrate von CD4-positiven Zellen im Pankreas bei NK-Zelldepletion und DBTC-Pankreatitis.

Zur NK-Zelldepletion (D = Depletion) wurden gesunden jungen Ratten (n = 6) mehrfach AK gegen CD161 intraperitoneal injiziert. Die Tiere der Kontrollgruppe (K = Kontrolle) bekamen statt der CD161-AK entweder unspezifische IgG-AK (n = 7) injiziert oder blieben unbehandelt (n = 5). Zusätzlich erhielten alle Ratten einmalig 6 mg DBTC/kg KG in die Schwanzvene injiziert. Nach 4 Wochen wurden sie getötet und die Pankreata entnommen. Anschließend wurden die entsprechenden Färbungen CD4-positiver Zellen im Gewebe angefertigt und die verblindeten Präparate mit Hilfe eines Lichtmikroskops ausgezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6 bzw. 12 unabhängigen Proben (Depletion bzw. Kontrolle).

5 Diskussion

Pankreatische Sternzellen (PSZ) sind seit ca. 15 Jahren als Hauptproduzenten der Organfibrose während der CP, aber auch bei Pankreaskarzinomen bekannt [Haber *et al.*, 1999; Jaster, Emmrich, 2008]. Die Aktivierung von PSZ und die damit verbundene gesteigerte Synthese von EZM nach einer Schädigung des Pankreas sind Komponenten einer physiologischen Wundheilungsreaktion. Dennoch ist das dauerhafte Vorhandensein aktivierter PSZ mit einer progredienten Fibrosierung schädlich für das Organ. Diese Schäden reichen bis hin zur endokrinen und exokrinen Insuffizienz des Pankreas.

Die Fragestellung dieser Arbeit war, ob Seneszenzprozesse an der Regulation der fibrotischen Wundheilungsreaktion im Pankreas beteiligt sind. Dabei war auch von Interesse, ob NK-Zellen, ähnlich wie bei der Leberfibrose [Krizhanovsky *et al.*, 2008], bei der Elimination von Sternzellen *in vivo* eine wichtige Rolle spielen. Die Arbeitshypothese lautete: Nach Pankreasschädigung werden PSZ aktiviert, d.h. sie proliferieren und geben EZM in die Umgebung ab. Danach werden PSZ seneszent, proliferieren also nicht mehr und werden anschließend eliminiert.

Das Verständnis der Mechanismen, welche zum Stopp der Fibrosierung führen, ist essentiell für die zielgerichtete Beeinflussung dieses Prozesses. Potentielle Therapiemöglichkeiten der CP mit Verhinderung der genannten endo- und exokrinen Insuffizienz könnten sich daraus für die Zukunft ableiten lassen.

5.1 Aktivierung und Seneszenz von PSZ in Zellkultur

Für die Zellkulturversuche wurden PSZ in Kulturplatten ausgesät und wöchentlich passagiert. Während der Passage wurden Zellen entnommen und auf Glasplättchen ausgesät. Nach dem Anwachsen wurden diese Zellen dann auf die Marker α -SMA bzw. SA- β -Gal hin untersucht.

Die Zellkulturversuche dienten zum Nachweis der Aktivierung und Seneszenz von PSZ *in vitro*. Zur Untersuchung der PSZ-Aktivierung wurde die Fluoreszenzfärbung von α -SMA, für die PSZ-Seneszenz die Färbung mit dem *Senescence β -Galactosidase Staining Kit* genutzt.

Die Aktivierung der PSZ fand durch den Kontakt zur Plastikoberfläche der Kulturplatten statt [Apte *et al.*, 1998]. Zunächst war anhand der α -SMA-Färbung ein starker Anstieg des Anteils aktivierter PSZ bereits in der zweiten Passage (P2) im Vergleich zur ersten Passage (P1) zu erkennen. Das Maximum der α -SMA-Expression war nach 4 Wochen Kulturdauer (P4)

erreicht. Anschließend wurde eine leichte Abnahme bis zur siebenten Passage (P7) nachgewiesen.

Das Protein α -SMA ist ein Baustein des Zytoskeletts von glatten Muskelzellen und Perizyten [Skalli *et al.*, 1989]. Bevor herausgefunden wurde, dass α -SMA als Surrogatmarker für die Aktivierung von PSZ geeignet ist, war es bereits als solcher für HSZ bekannt [Apte *et al.*, 1998]. Dabei zeigte sich bereits früh in der Kultur ein Anstieg von α -SMA in PSZ. In späteren Studien wurden Stimulatoren der Aktivierung, gemessen an der α -SMA-Expression, der Proliferationsrate und/oder der EZM-Syntheseleistung, gefunden. Dazu gehören u.a. Ethanol und Acetaldehyd [Apte *et al.*, 2000], aber auch Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie z.B. TGF- β , PDGF, TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-10 [Apte *et al.*, 1999; Mews *et al.*, 2002]. Der längerfristige Zeitverlauf der α -SMA-Expression in PSZ *in vitro* wurde bisher auf mRNA-Ebene untersucht [Fitzner *et al.*, 2012]. Diese Daten zeigen ebenfalls einen frühen Anstieg von α -SMA zur zweiten und dritten Passage, während die weitere Expression ab Passage 4 wieder um ca. 50 % abfällt. Das könnte Ausdruck dessen sein, dass nach einer anfänglich starken Aktivierungsphase weniger PSZ aktiviert werden müssen, um das hohe Niveau α -SMA-positiver Zellen zu halten. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten auf der Proteinebene stehen in Übereinstimmung mit einer Vorgängerarbeit, in der ebenfalls eine Zunahme der α -SMA-Expression im Kulturverlauf beobachtet wurde [Jaster *et al.*, 2002].

Die SA- β -Gal-Expression war zur ersten Passage niedrig und stieg zur zweiten Passage sehr stark an. Auf eine sich anschließende Senke zu den Zeitpunkten der Passage 3 und 4 folgt ein weiterer Anstieg. Insgesamt bildet sich ein biphasischer Verlauf des Anteils seneszenten Zellen, gemessen an der SA- β -Gal-Expression, ab. Die maximale Ausprägung der SA- β -Gal-positiven Zellen zum Zeitpunkt der zweiten Passage mit darauf folgendem starken Abfall trat unerwartet ein. In Vorarbeiten dazu stellte sich ein kontinuierlicher Anstieg der SA- β -Gal-Expression über 5 bzw. 6 Passagen dar [Müller, 2010; Fitzner *et al.*, 2012]. Möglich wäre, dass zur primären Einsaat oder auch zur ersten Passage weniger Zellen zur Verfügung standen als bei den Vorarbeiten. Primärzellen können allerdings nur eine begrenzte Anzahl Teilungen durchmachen, bis sie das Seneszenzstadium erreichen [Hayflick, 1965; Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007]. Das könnte dazu geführt haben, dass sich die niedrigere Anzahl Zellen bis zur Konfluenz häufiger teilen musste und sich so dem Stadium der Seneszenz schneller näherte. Die Senke SA- β -Gal-positiver PSZ bei P3 und P4 könnte darauf zurückzuführen sein, dass sowohl eine schlechtere Ablösung seneszenten Zellen von der Plastikober-

fläche als auch ein schlechteres Anwachsen an der Kulturplatte im Vergleich zu nicht-seneszenten Zellen stattfindet. Daraus resultiert ein häufiges Verlorengelassen seneszenten PSZ. Jedoch erklärt das alleine nicht, warum die anschließend noch kleinere teilungsfähige Zellpopulation anschließend nicht noch schneller in das Seneszenzstadium übergeht. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass PSZ nicht nur vor Ort im Pankreas anwesend sind, sondern ebenfalls aus dem Knochenmark einwandern können [Watanabe *et al.*, 2009; Sparmann *et al.*, 2010]. Das deutet auf die Existenz verschiedener Subgruppen dieser Zellen hin. Es ist denkbar, dass Zellen einer Gruppe bereits mehr Teilungen durchlaufen haben als die einer anderen oder eine Gruppe von Zellen häufiger teilungsfähig sein könnte als eine andere. Die Ursache für die Abweichung der hier gezeigten Daten bleibt letztlich aber unklar. Die Ergebnisse belegen, dass ruhende PSZ in Zellkultur einen Aktivierungsprozess durchlaufen und ebenfalls im Laufe der Zeit teilweise das Seneszenzstadium erreichen. Ein regelhafter Zeitverlauf lässt sich aus diesen Daten nicht ableiten. Jedoch machen die Vorarbeiten zur Seneszenz von PSZ *in vitro* die zeitliche Abfolge von Aktivierung und darauf folgender Seneszenz dennoch wahrscheinlich. Weitere Versuche sind zur Klärung dieser Fragestellung nötig. Interessant ist dabei auch, dass der Anteil seneszenten Zellen trotz fortgesetzter Passagierung niemals 25 % überstieg. Die Beobachtung einer unvollständigen Seneszenz der PSZ selbst nach langer Kulturdauer steht in Übereinstimmung mit Vorgängerstudien [Fitzner *et al.*, 2012] und könnte darauf hindeuten, dass innerhalb der PSZ-Population eine Fraktion mit lang anhaltendem Selbsterneuerungspotenzial existiert. Ob es sich dabei um Stamm- oder zumindest Progenitorzellen handelt, wie verschiedentlich postuliert, sollte in Folgestudien weiter analysiert werden [Mato *et al.*, 2009; Kordes *et al.*, 2012].

5.2 Seneszenz im Kontext der DBTC-Pankreatitis

Seneszenz bezeichnet einen Alterungsprozess, welcher dazu führt, dass sich Zellen in einen irreversiblen Zellzyklusarrest begeben. In Zusammenhang mit der Verhinderung maligner Entartung von Zellen wird diese Thematik bereits längere Zeit beforscht [Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007]. Die Arbeitsgruppe um Krizhanovsky beschäftigte sich dagegen erstmals mit der Rolle seneszenten Zellen in nichtmalignen Erkrankungen. Sie zeigte, dass sich sowohl in fibrotischem Mäuselebergewebe als auch bei der menschlichen Leberfibrose seneszente HSZ ansammeln. Im Verlauf der Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass die Seneszenz von

HSZ die Leberfibrose terminieren kann und selbst die Fibrose potenziell reversibel ist [Krizhanovsky *et al.*, 2008].

Die Rolle von Seneszenzprozessen bei der Termination der Pankreasfibrose wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig untersucht. Hierzu wurden Studien anhand des Modells der DBTC-Pankreatitis von Ratten durchgeführt. Dabei wurden die mit 6 bzw. 8 mg/kg KG DBTC behandelten Tiere zu den jeweiligen Zeitpunkten (1, 2, 4 und 8 Wochen) nach Pankreatitisinduktion getötet und das Pankreas entnommen. Das *Caput pancreaticum* wurde in Paraformaldehyd eingelegt, in Paraffin eingebettet und für die HE-Färbung bereitgestellt. *Corpus* und *Cauda* wurden dagegen nach Zugabe von Tissue-Tek OCT Gewebeschutzlösung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und kamen für die SA- β -Gal-Färbung sowie die IHC-Färbungen zum Einsatz. Die IHC umfasste dabei Marker für PSZ, deren Aktivierung und Zellteilung sowie für verschiedene Zellen des Immunsystems, um die Daten zur Seneszenz von PSZ *in vivo* in ein größeres Gesamtbild einordnen zu können.

5.2.1 Entzündung und Fibrose

Die Entzündungsreaktion, gemessen an den im Methodenteil genannten Kriterien in der HE-Färbung, hatte in beiden Dosisgruppen ihr Maximum nach 1 - 2 Wochen und wurde dann über die Zeit schwächer. Die Entzündung blieb jedoch, ebenso wie die fibrotische Reaktion, die gesamte Beobachtungszeit deutlich über dem Kontrollniveau. Die Daten der Entzündungsstärke stimmen mit den Daten einer Vorarbeit auf dem Gebiet der DBTC-Pankreatitis überein [Merkord *et al.*, 1997]. In Bezug auf die Fibrose bei DBTC-Pankreatitis zeichnet die Literatur das Bild einer Steigerung über die Zeit [Merkord *et al.*, 1997; Sparmann *et al.*, 1997; Merkord *et al.*, 1999]. Dies deckt sich nicht vollständig mit den Daten dieser Arbeit, da während des Beobachtungszeitraumes spätestens nach 8 Wochen tendenziell sogar eine Abnahme der Fibrosierung erkennbar war. Das könnte damit zusammenhängen, dass in dieser Untersuchungserie zum ersten Zeitpunkt überdurchschnittlich viele stark erkrankte Tiere aufgearbeitet wurden, da es unwahrscheinlich war, dass diese Tiere länger überleben würden. Demzufolge gab es in der letzten Gruppe mehr Tiere, welche weniger stark erkrankt waren. Aus ethischen und tierschutzrechtlichen Gründen ist eine beliebige Wiederholung der Versuche nicht vertretbar. Die Zusammenstellung von Gruppen mit identischen Krankheitsvoraussetzungen gestaltet sich daher schwierig.

5.2.2 Seneszenz

Bereits der Teilungsstopp von Zellen kann auf einen Zellzyklusarrest und damit auf Seneszenz hinweisen. Jedoch besteht die Problematik, dass sich auch ruhende PSZ oder ausdifferenzierte Zellen nicht im Zellzyklus befinden. Die SA- β -Gal-Färbung ist in der Lage, seneszente Zellen von ruhenden Fibroblasten und ausdifferenzierten Zellen zu unterscheiden [Dimri *et al.*, 1995]. Dieses Wissen fand in der Vergangenheit auch an der Leber Anwendung. Hier konnte bereits nachgewiesen werden, dass Seneszenz die Leberfibrose im Rahmen eines Tiermodells der Leberzirrhose terminiert [Krizhanovsky *et al.*, 2008].

Die Untersuchung des Pankreasgewebes auf SA- β -Galactosidase ergab Hinweise darauf, dass auch im Verlauf der DBTC-Pankreatitis zelluläre Seneszenzprozesse eine Rolle spielen. Insbesondere in der höheren Dosisgruppe (8 mg/kg KG DBTC) fand sich eine starke, flächenhaft ausgeprägte SA- β -Gal-Expression bereits zum frühesten Zeitpunkt von 1 - 2 Wochen nach Induktion der Pankreatitis. Im Verlauf zeigte sich dann eine stetige Abnahme parallel zur Abnahme der Entzündungsreaktion. Die niedrigere Dosisgruppe (6 mg/kg KG DBTC) erreichte die höchste SA- β -Gal-Expression nach 4 Wochen, ohne sich allerdings von der Kontrollgruppe statistisch signifikant zu unterscheiden. Das Ausmaß der Seneszenzbeteiligung bei einer DBTC-Pankreatitis scheint demnach recht stark von der DBTC-Dosis und damit auch von der Erkrankungsstärke abhängig zu sein. Bei den seneszenten Zellen handelt es sich wahrscheinlich um PSZ. Hinweise darauf sind die interazinäre Lokalisation der gefärbten Zellen und eine starke Überlappung von SA- β -Gal- und α -SMA-positiven Regionen in seriell angefertigten Gewebeschnitten.

5.2.3 PSZ und Aktivierung

Desmin-positive Zellen waren bereits in den Kontrollgeweben in großen Mengen zwischen den Azini des Parenchyms zu finden. Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse von Apte *et al.* (1998). Diese Arbeitsgruppe fand heraus, dass Desmin nicht nur ein Marker für HSZ sondern auch für PSZ ist [Apte *et al.*, 1998]. In der eigenen Untersuchung wurde ein starker Anstieg Desmin-positiver Zellen zum frühesten Beobachtungszeitpunkt in beiden Gruppen beobachtet, an den sich ein stetiger Abfall der Zahl dieser Zellen anschloss. Auch wenn Desmin kein Sternzell-spezifischer Marker ist, so können diese Daten doch als weiterer Hinweis auf die Bedeutung von Sternzellen im Entzündungs- und Fibroseprozess der DBTC-

Pankreatitis gelten. Desmin-positive Zellen sind allerdings nur im Pankreasgewebe von Ratten und nicht von Menschen zu finden [Haber *et al.*, 1999].

Die Aktivierung von PSZ nach der Schädigung des Pankreas stellt eine Umwandlung der Zellen hin zu einem myofibroblastären Phänotyp dar [Apte *et al.*, 1998; Jaster, Emmrich, 2008]. So dient α -SMA, welches zum Zytoskelett glatter Muskelzellen und Perizyten gehört [Skalli *et al.*, 1989], als Marker für aktivierte PSZ [Apte *et al.*, 1998]. In beiden Dosisgruppen dieser Arbeit erfolgte ein Anstieg der Zellen, welche α -SMA exprimieren. In der Gruppe mit der höheren DBTC-Dosis stiegen die Werte dabei deutlich stärker, während in der niedriger dosierten Gruppe zu keinem Zeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe erreicht wurde. Als besonders bemerkenswert erscheint die Tatsache, dass in beiden Gruppen der Zeitverlauf der α -SMA-Expression dem der histologisch beobachteten Fibrose stark ähnelt. In der 6 mg-Gruppe fand sich sowohl für α -SMA-positive Zellen als auch für die Fibrose nach 1 - 2 Wochen das Maximum mit einem anschließenden stetigen Abfall bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes. Die 8 mg-Gruppe zeigte für beide Parameter ihr Maximum nach 4 Wochen und ihr Minimum nach 8 Wochen. Diese Ergebnisse machen den engen Zusammenhang zwischen aktivierten PSZ und dem Ausmaß der Fibrose bei der DBTC-Pankreatitis deutlich und stimmen mit den Daten der Arbeit von Haber *et al.* (1999) überein. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass in einem Tiermodell der Pankreasfibrose (TNBS-Modell) mittels Desmin- bzw. α -SMA-Färbung identifizierte PSZ mit fibrotischen Regionen kolokalisiert waren. An Gewebe von menschlicher CP wurde nachgewiesen, dass α -SMA-positive Zellen die Quelle für die mRNA von Prokollagen $\alpha 1$ (I) sind und sich ebenfalls in fibrotischen Bereichen des Organs befinden. Zusammengefasst belegen diese Daten, dass PSZ die Hauptproduzenten der pankreatischen EZM sind [Haber *et al.*, 1999].

5.2.4 Proliferierende Zellen

Das Protein Ki67 wird in Zellen dann exprimiert, wenn sie sich in einer der vier Phasen (G1-, S-, G2-, M-Phase) des Zellzyklus befinden [Scholzen, Gerdes, 2000]. Demzufolge kann anhand der Ki67-Expression abgeschätzt werden, wie viele Zellen sich gerade im Teilungsprozess befinden. Ki67 wurde in beiden Versuchsgruppen zum ersten Untersuchungszeitpunkt (1 - 2 Wochen nach DBTC-Gabe) am stärksten exprimiert. Während in der höheren Dosisgruppe auch nach 4 Wochen noch ähnlich viele Zellteilungen stattfanden, nahm die Teilungsrate in der niedriger dosierten Gruppe bereits stark ab. Nach 8 Wochen befand sich

die 8 mg-Gruppe nahe am und die 6 mg-Gruppe innerhalb des Kontrollniveaus. Diese Ergebnisse passen gut zur Steigerung der Zahl Desmin-positiver Zellen zu den ersten beiden Zeitpunkten. Demnach handelte es sich bei den Zellen im Zellzyklus wahrscheinlich hauptsächlich um proliferierende PSZ.

5.2.5 Zellen des Immunsystems

Die immunhistochemischen Untersuchungen zu Zellen des Immunsystems wurden mit Hilfe von Antikörpern gegen die Proteine CD161 (NK-Zellen in Rattengewebe), CD4 (T-Helferzellen), CD8a (zytotoxische T-Lymphozyten), HIS36 (Makrophagen) sowie RK-4 (Granulozyten) durchgeführt. In der 6 mg-Gruppe zeigte sich für CD4, HIS36 und RK-4 ein Maximum der Zahl angefärbter Zellen nach 1 - 2 Wochen. Während die HIS36-exprimierende Zellpopulation über die Zeit beinahe konstant blieb, fielen die Zahlen CD4- und RK-4-positiver Zellen stetig ab und erreichten nach 8 Wochen etwa das Kontrollniveau. Dagegen hatten CD161- und CD8a-positive Zellen ihr Maximum nach 4 Wochen. Auffallend ist, dass in der 8 mg-Gruppe alle Immunzellen nach 1 - 2 Wochen ihr Maximum erreichten. Die ersten 4 Wochen des Beobachtungszeitraumes waren alle Immunzellen dieser Gruppe in deutlich höherer Anzahl im Pankreasgewebe detektierbar als in der niedriger dosierten Gruppe.

Abgesehen von den CD8a-positiven Zellen, welche zum Zeitpunkt 8 Wochen einen erneuten leichten Anstieg verzeichneten, zeigten alle anderen Immunzellen einen stetigen Abfall bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes. Dennoch blieben alle Immunzellen in der 8 mg-Gruppe über dem Kontrollniveau. Diese Daten stimmen weitgehend mit den Ergebnissen von Sparmann *et al.* (1997) überein. Die Arbeitsgruppe untersuchte ebenfalls den Zeitverlauf der Gewebsinfiltration mit Granulozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten im Rahmen der DBTC-Pankreatitis und gelangte zu ähnlichen Beobachtungen. Der wichtigste Unterschied zu dieser Arbeit besteht darin, dass für T-Lymphozyten ein deutlich langsamerer Anstieg verzeichnet wurde [Sparmann *et al.*, 1997]. Möglicherweise sind hierfür Unterschiede im Reaktionsmuster der ausgewählten Rattenstämme (Lewis-1W bzw. Lewis) verantwortlich. In einer Folgestudie der Arbeitsgruppe Sparmann und Emmrich wurden die T-Lymphozyten in CD4- und CD8-positive Zellen unterschieden. Hier wurde nachgewiesen, dass in der Akutphase die CD4-Zellen weitgehend dominierten, während in der chronischen Phase die CD8-Zellen stetig an Bedeutung gewannen [Sparmann *et al.*, 2001]. Unter Berück-

sichtigung von Daten zur humanen CP, welche ebenfalls eine erhöhte CD8-Zellzahl im Pankreasgewebe zeigten [Emmrich *et al.*, 1998], schlossen die Autoren, dass CD8-Zellen vermutlich eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses spielen. Die Daten der vorliegenden Arbeit passen zu diesem Ansatz, da zumindest in der höher dosierten Gruppe die CD8a-positiven Zellen nach 8 Wochen tendenziell wieder leicht anstiegen. Rieckeheer übertrug Lymphozyten, welche aus Ratten mit DBTC-CP isoliert wurden, auf Ratten, welche eine leichte DBTC-Pankreatitis durchmachten. Dieser Lymphozytentransfer führte dazu, dass die Pankreatitis chronifizierte anstatt auszuheilen, was die wichtige Rolle von T-Zellen im Erkrankungsprozess unterstreicht [Rieckeheer, 2012].

5.2.6 Histopathologische Veränderungen im Verlauf der DBTC-Pankreatitis

In der Gesamtbetrachtung der histologischen Daten waren die Maxima der einzelnen pathologischen Veränderungen meist nach 1 - 2 Wochen erreicht. Selten zeigte sich ein Maximum erst 4 Wochen nach DBTC-Gabe. Anschließend waren beinahe alle Marker rückläufig. Die Chronifizierung der Pankreatitis ist besonders in der 8 mg-Gruppe klar zu erkennen, da 8 Wochen nach DBTC-Gabe alle Parameter, in den meisten Fällen auch deutlich, über denen der Kontrolle blieben. Der Unterschied in der DBTC-Dosis bewirkte wie erwartet eine teilweise starke Differenz der Erkrankungsstärke, gemessen an den dargestellten Daten. Seneszenz spielt nicht nur während der Leberfibrose, sondern auch während der Pankreasfibrose eine Rolle und tritt bereits zum frühesten Beobachtungszeitpunkt, also nach 1 - 2 Wochen, gleichzeitig mit aktivierten PSZ und massiver Immunzellinfiltration auf. Kolokalisationsstudien ergaben, dass sowohl SA- β -Gal-positive Zellen, α -SMA-exprimierende Zellen (aktivierte PSZ) als auch CD4-positive T-Helferzellen und CD161-positive NK-Zellen [Fitzner *et al.*, 2012] in enger räumlicher Nachbarschaft zueinander lagen bzw., im Falle der beiden erstgenannten Zelltypen, wahrscheinlich sogar miteinander identisch waren. Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass die Vermehrung, Aktivierung und Seneszenz von PSZ sowie die Infiltration mit Immunzellen zu den jeweils untersuchten Zeitpunkten parallel und am gleichen Ort abliefen. Daraus kann abgeleitet werden, dass diese Prozesse wahrscheinlich miteinander verbunden sind und sich gegenseitig beeinflussen.

5.3 DBTC-Pankreatitis und die Rolle von NK-Zellen

Die Arbeiten von Krizhanovsky *et al.* (2008) führten zu der Erkenntnis, dass seneszente HSZ vermehrt NK-Zell-stimulierende Zytokine exprimieren. Im Anschluss konnte von den Autoren zunächst *in vitro* gezeigt werden, dass in Kokulturen von HSZ mit NK-Zellen seneszente HSZ effektiv beseitigt wurden. Auch *in vivo* wurde dieser Vorgang untersucht. So konnte die Arbeitsgruppe in der gleichen Studie nachweisen, dass die Depletion von NK-Zellen dazu führte, dass mehr seneszente HSZ im Lebergewebe verblieben und die Fibrose zunahm. Die Schlussfolgerung war, dass das Immunsystem in der Lage ist, seneszente Zellen in fibrotischem Gewebe zu eliminieren [Krizhanovsky *et al.*, 2008]. Zur Analyse der Übertragbarkeit der Befunde auf die Fibrose des Pankreas untersuchte die eigene Arbeitsgruppe in Kokulturstudien den Effekt von NK-Zellen auf PSZ. Auch bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass mit dem Seneszenz-Induktor Doxorubicin behandelte PSZ durch NK-Zellen effektiver eliminiert wurden als unbehandelte Sternzellen. Ähnliche Ergebnisse erbrachte jedoch auch die Kokultur von PSZ mit ungereinigten Milzzellen [Fitzner *et al.*, 2012], so dass Zweifel an einer spezifischen Funktion von NK-Zellen verblieben. Um diese Vorgänge auch *in vivo* an der Pankreasfibrose nachvollziehen zu können, wurden schließlich weitere DBTC-Versuche durchgeführt. Dazu wurden die verwendeten Ratten zunächst mit CD161-Antikörpern behandelt, um die vorhandenen NK-Zellen weitgehend zu eliminieren. Anschließend wurde den Tieren einmalig 6 mg/kg KG DBTC injiziert. Auch im Verlauf bekamen die Ratten weiterhin regelmäßig anti-CD161-Injektionen. Der Erfolg der NK-Zelldepletion war an den Blutuntersuchungen deutlich zu erkennen [Fitzner *et al.*, 2012]. Auch im Pankreasgewebe der depletierten Tiere fanden sich signifikant weniger NK-Zellen als in den Kontrolltieren. Die NK-Zelldepletion hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Entzündungsstärke, die Fibrosierung, die Aktivierung und Seneszenz von PSZ und die Infiltration des Pankreas mit anderen Immunzellen.

Die Ergebnisse der Kokulturstudien [Fitzner *et al.*, 2012] und der NK-Zelldepletion in Ratten mit DBTC-Pankreatitis legen nahe, dass NK-Zellen zwar in größerer Zahl im geschädigten Gewebe vorhanden sind, diese jedoch den Eliminationsprozess von PSZ offenbar nicht spezifisch beeinflussen. In noch weit höherer Zahl lagen CD4-positive T-Helferzellen vor, welche wahrscheinlich einen größeren Einfluss auf das Entzündungsgeschehen haben. Die Aktivierung von PSZ wird durch zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren stimuliert [Bachem *et al.*, 1998; Apte *et al.*, 1999; Mews *et al.*, 2002]. Lymphozyten waren in

Kokulturstudien auch in der Lage, die Proliferation von PSZ und deren EZM-Synthese zu steigern [Sparmann *et al.*, 2005]. Vermutlich sind Lymphozyten aber nicht nur imstande, PSZ zu aktivieren, sondern auch seneszente PSZ *in vivo* zu eliminieren und dadurch auch die Fibrosierung zu stoppen. Um das zu bestätigen, sind weitere Studien zur Funktion der verschiedenen Immunzellen, insbesondere von CD4-positiven T-Helferzellen, notwendig.

5.4 Integrative Betrachtung

Während die Aktivierung von PSZ und die damit beginnende Fibrosierung inzwischen gut bekannt sind, bleiben die Beendigung des Wundheilungsprozesses und damit auch die Elimination überschüssiger PSZ noch rätselhaft. Im Verlauf einer CP führt die Aufrechterhaltung der Aktivierung von PSZ, z.B. über autokrine Loops [Jaster, Emmrich, 2008], zur fortschreitenden Fibrose des Pankreas (Abb. 5.1). Eine Möglichkeit, wie es zur Reduktion von aktivierten PSZ kommen könnte, ist die Beseitigung durch Apoptose. Studien an Zellkulturen mit PSZ zeigten, dass die Apoptoseinduktoren CD95L und TRAIL auch die Eliminierung von PSZ durch Apoptose fördern können [Klonowski-Stumpe *et al.*, 2002]. Eine weitere Option stellt der Übergang von aktivierten PSZ zurück in einen ruhenden, fibroblastären Phänotyp dar [Manapov *et al.*, 2005]. Allerdings führt ein solcher Prozess noch nicht zur Normalisierung der durch die vorangegangene Proliferation gesteigerten Zahl von PSZ.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die Hypothese, dass aktivierte PSZ in ein Seneszenzstadium übergehen können. Dies trägt wahrscheinlich zur Beendigung der Fibrosierung bei und könnte es dem Immunsystem erleichtern, PSZ zu eliminieren. Die dafür in der Leber verantwortlichen NK-Zellen sind im entzündeten Pankreasgewebe zwar ebenfalls nachweisbar, ein spezifischer Beitrag dieser Zellen zur Termination der Fibrose bleibt jedoch mindestens zweifelhaft. Um herauszufinden, wie genau zelluläre Seneszenzprozesse im Pankreas zum Fibrorestopp beitragen, sollten deshalb weitere Studien folgen.

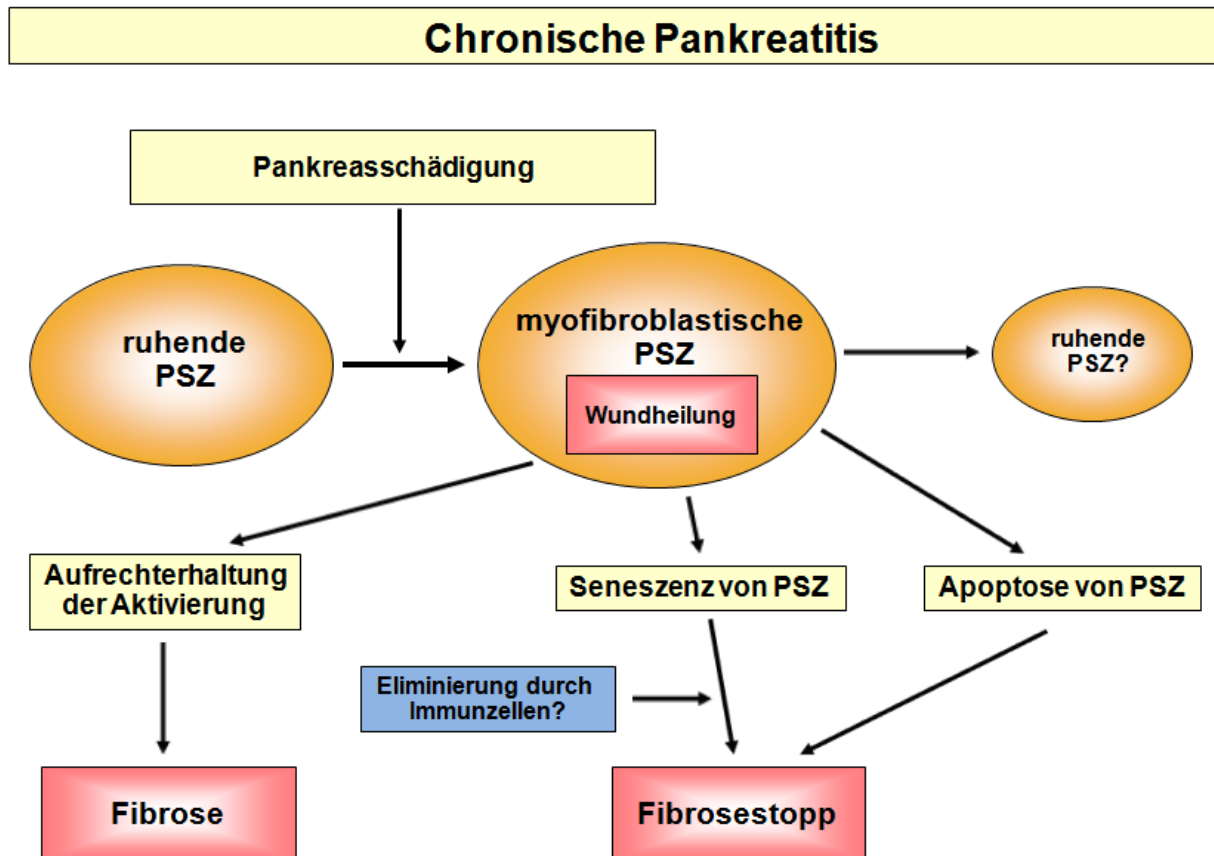


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung von Mechanismen zur Termination der Fibrosierung während einer chronischen Pankreatitis. (Erklärungen siehe Text)

6 Zusammenfassung

Die chronische Pankreatitis (CP) ist eine Erkrankung, welche bisher nicht zufriedenstellend behandelbar ist. Um sinnvolle Therapieansätze entwickeln zu können, ist es notwendig, den Verlauf der CP zu studieren. Während der menschlichen CP kommt es zur vermehrten Produktion von Bindegewebe durch pankreatische Sternzellen (PSZ), was schließlich bis hin zur Fibrose mit exo- und endokriner pankreatischer Insuffizienz führen kann. Die Ablagerung der extrazellulären Matrix (EZM) ist dabei zunächst Teil einer physiologischen Wundheilung und wird schließlich erst durch die fehlende Beendigung dieses Prozesses pathologisch.

Ähnlich wie die PSZ im Pankreas konnten bereits vorher hepatische Sternzellen (HSZ) in der Leber identifiziert werden. Diese Zellen bilden in der Leber ebenfalls die EZM während der Leberfibrose. Es gelang der Nachweis, dass Seneszenzprozesse in HSZ die Leberfibrose terminieren und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) senescente HSZ effektiv eliminieren können.

Die Studien dieser Arbeit sollten zeigen, ob Seneszenz auch während der Fibrose der CP eine Rolle spielt. Zusätzlich sollten die Ergebnisse in den Kontext verschiedener Entzündungsstärken eingeordnet und im späteren Verlauf die Rolle von NK-Zellen im Gewebe der CP untersucht werden. Dabei wurde von der Arbeitshypothese ausgegangen, dass PSZ nach Schädigung des Pankreas aktiviert werden (Proliferation, gesteigerte EZM-Synthese), danach in das Stadium der Seneszenz übergehen (irreversibler Teilungsstopp) und schließlich eliminiert werden.

In Zellkulturstudien wurden PSZ über 7 Wochen einmal wöchentlich passagiert und ebenso oft auf den Aktivierungsmarker *α -smooth muscle actin* (α -SMA) sowie auf Seneszenz-assoziierte- β -Galactosidase (SA- β -Gal) untersucht. *In vivo*-Versuche erfolgten mit Hilfe des Modells der Dibutylzinndichlorid (DBTC)-Pankreatitis, welche verschiedene Eigenschaften der menschlichen CP, wie z.B. die Entwicklung einer Organfibrose oder die Infiltration mit Immunzellen, abbildet. In den dabei verwendeten Ratten wurde mittels 6 bzw. 8 mg DBTC/kg KG eine Pankreatitis induziert. Jeweils 1, 2, 4 oder 8 Wochen nach der Pankreatitisinduktion wurden die Tiere getötet und die Pankreata für histologische Studien entnommen. Zwischen den Ergebnissen der beiden ersten Zeitpunkte (1 und 2 Wochen) wurden keine systematischen Unterschiede beobachtet. Daher erfolgte eine Zusammenlegung dieser Daten zu einem einzigen Zeitpunkt (1 - 2 Wochen) in den jeweiligen Dosisgruppen. Als Kontrollen gegenüber den erkrankten Tieren wurden gesunde Ratten

verwendet, welche 0,9 % NaCl-Lösung injiziert bekamen oder unbehandelt blieben. Aufgrund fehlender histologischer Unterschiede wurden beide Gruppen zu einer Kontrollgruppe zusammengefasst. Untersucht wurde das Gewebe auf Veränderungen in der HE-Färbung sowie auf Zellen, welche SA- β -Gal, Desmin, α -SMA, Ki67 oder verschiedene Immunzellantigene exprimieren. Um herauszufinden, ob NK-Zellen auch im Pankreas die Funktion der Elimination seneszenten Zellen innehaben, wurden in Ratten die NK-Zellen depletiert und erneut mit 6 mg DBTC/kg KG eine Pankreatitis ausgelöst. Die Tiere wurden nach 4 Wochen getötet und die Pankreata zu histologischen Untersuchungen, wie oben genannt, herangezogen. Als Vergleichsgruppe dienten Tiere, welche statt der Antikörper gegen NK-Zellen entweder unspezifische IgG-Antikörper injiziert bekamen oder unbehandelt blieben.

In den Untersuchungen der Zellkulturen zeigte sich ein starker Anstieg sowohl von α -SMA als auch von SA- β -Gal von der ersten zur zweiten Passage. Während sich α -SMA dann über den gesamten Beobachtungszeitraum stark erhöht zeigte, wurde bei der Expression von SA- β -Gal eine Senke zur dritten und vierten Passage mit folgendem zweiten Maximum zur sechsten Passage sichtbar. Letztlich belegen die Daten dennoch, dass während der Kultivierung von PSZ nicht nur eine Aktivierung, sondern auch teilweise der Übergang von PSZ in das Seneszenzstadium erfolgt. Auch Voruntersuchungen zeigten, dass PSZ bei längerer Kulturdauer nur zu einem gewissen Anteil seneszent wurden. Diese Tatsache weist darauf hin, dass unter PSZ eine Subpopulation mit langanhaltendem Selbsterneuerungspotential existieren könnte.

Die histologischen Studien der DBTC-Pankreatitis zeigten für alle untersuchten Parameter und in beiden Dosisgruppen immer einen Anstieg gegenüber der Kontrollgruppe zum frühesten Untersuchungszeitpunkt (1 - 2 Wochen). Das Maximum wurde dabei meist zu diesem Zeitpunkt, spätestens aber zum Zeitpunkt 4 Wochen erreicht. Die Ergebnisse der höheren Dosisgruppe (8 mg DBTC/kg KG) lagen über den gesamten Zeitverlauf und für alle Parameter durchgehend über den Daten der niedrigeren Dosisgruppe (6 mg DBTC/kg KG), was die Dosisabhängigkeit der DBTC-Pankreatitis belegt. Die Werte für α -SMA, Ki67 (Proliferationsmarker) sowie RK-4 (Granulozyten) fielen in der 6 mg-Gruppe nach 8 Wochen wieder auf das Niveau der Kontrollgruppe ab. Dagegen waren die Ergebnisse aller Parameter in der 8 mg-Gruppe durchgehend über denen der Kontrollgruppe und belegen deutlich die Chronifizierung der Pankreatitis. Die Expression von SA- β -Gal zeigte in der höheren Dosisgruppe einen starken Anstieg bereits zum Zeitpunkt 1 - 2 Wochen und fiel im Verlauf

ab. Es wurde eine hohe räumliche und zeitliche Nähe zwischen α -SMA-, β -Gal-, CD4 (T-Helferzellen)- und CD161 (NK-Zellen)-positiven Zellen nachgewiesen. Wahrscheinlich handelt es sich nicht nur im Fall von α -SMA-exprimierenden Zellen, sondern auch von β -Gal-positiven Zellen um PSZ. Die Vermehrung, Aktivierung und Seneszenz von PSZ sowie die Infiltration mit Immunzellen erfolgte demnach zeitlich und örtlich parallel. Die vorhandenen Zellen und die beschriebenen Prozesse interagieren vermutlich stark miteinander.

Die Depletion von NK-Zellen in Ratten für weitere DBTC-Studien konnte erfolgreich durchgeführt werden, führte allerdings bei keinem der oben aufgeführten Parameter zu einer signifikanten Veränderung im Vergleich zur nicht depletierten Kontrollgruppe. Die Daten zeigen, dass NK-Zellen wahrscheinlich keine spezifische Rolle bei der Eliminierung von PSZ im Pankreas spielen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen nach, dass Seneszenzprozesse während einer CP mit begleitender Organfibrose von Bedeutung sind und örtlich sowie zeitlich parallel mit der Aktivierung von PSZ und der Infiltration mit Immunzellen ablaufen. Um den Beitrag von zellulärer Seneszenz zur Termination der Fibrose besser zu verstehen, sind auf diesem Gebiet Folgestudien erforderlich. Dabei sollten weitere Immunzellen, insbesondere die bei einer CP stark vertretenen CD4-positiven T-Helferzellen, näher auf ihre Funktionen untersucht werden. Darauf aufbauend könnten neue Therapien entwickelt und geprüft werden, welche dann zur Verhinderung der exokrinen und endokrinen Pankreasinsuffizienz dienen sollten.

7 Thesen

1. Die Therapieoptionen der chronischen Pankreatitis (CP) sind bisher nicht zufriedenstellend. Um neue Therapien zu entwickeln, ist Grundlagenforschung zu Entstehung und Verlauf der Erkrankung notwendig.
2. Die progrediente Organfibrose, welche sich während der CP des Menschen entwickelt, führt zur exokrinen und endokrinen Insuffizienz des Pankreas. Das Verständnis der Terminationsprozesse der Fibrose bildet die Grundlage zur Prävention dieser Organschädigung.
3. Pankreatische Sternzellen (PSZ) stellen die Hauptproduzenten der extrazellulären Matrix im Pankreas dar. Während der Langzeitkultivierung von pankreatischen Sternzellen kommt es zur Aktivierung und teilweise zur Seneszenz dieser Zellen.
4. Es gibt PSZ mit langanhaltendem Selbsterneuerungspotential.
5. Die experimentelle Dibutylzinndichlorid(DBTC)-Pankreatitis erreicht dosisabhängig unterschiedliche Schweregrade und chronifiziert bei hoher Dosis.
6. Seneszenzprozesse spielen im Rahmen der von DBTC ausgelösten CP eine Rolle.
7. Entzündung, PSZ-Aktivierung, Seneszenz und Immunzellinfiltration erreichen ihr Maximum bis spätestens 4 Wochen nach Pankreatitisinduktion mit DBTC.
8. Vermehrung und Aktivierung von PSZ, Seneszenz sowie Infiltration mit Immunzellen erfolgen zeitlich und örtlich parallel. Die jeweiligen Zellen und Prozesse interagieren vermutlich stark.
9. Bei den seneszenten Zellen im fibrotischen Pankreas der Ratte handelt es sich überwiegend um PSZ.

10. Eine Beteiligung von Immunzellen, insbesondere CD4-positiven T-Helferzellen, an der Fibrosetermination durch Seneszenz ist den Ergebnissen zufolge wahrscheinlich, bedarf aber der experimentellen Untermauerung.
11. Natürliche Killerzellen haben keinen spezifischen Effekt auf die Eliminierung von PSZ und beeinflussen den Verlauf der DBTC-Pankreatitis nicht wesentlich.
12. Der Beitrag von zellulärer Seneszenz in PSZ zur Termination der Fibrose während der CP sollte in Folgestudien untersucht werden.

8 Literaturverzeichnis

1. Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut*. 1998; 43(1): 128–133.
2. Apte MV, Haber PS, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut*. 1999; 44(4): 534–541.
3. Apte MV, Phillips PA, Fahmy RG, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Naidoo D, Wilson JS. Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells. *Gastroenterology*. 2000; 118(4): 780–794.
4. Bachem MG, Schneider E, Groß H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grünert A, Adler G. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology*. 1998; 115(2): 421–432.
5. Ballardini G, Fallani M, Biagini G, Bianchi FB, Pisi E. Desmin and actin in the identification of Ito cells and in monitoring their evolution to myofibroblasts in experimental liver fibrosis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1988; 56(1): 45–49.
6. Bandyopadhyay D, Okan NA, Bales E, Nascimento L, Cole PA, Medrano EE. Down-regulation of p300/CBP histone acetyltransferase activates a senescence checkpoint in human melanocytes. *Cancer Res*. 2002; 62(21): 6231–6239.
7. Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37(5): 961–976.
8. Blander G, de Oliveira RM, Conboy CM, Haigis M, Guarente L. Superoxide dismutase 1 knock-down induces senescence in human fibroblasts. *J Biol Chem*. 2003; 278(40): 38966–38969.
9. Braganza JM. Pancreatic disease: a casualty of hepatic "detoxification"? *Lancet*. 1983; 322(8357): 1000–1003.
10. Cahen DL, Gouma DJ, Nio Y, Rauws EAJ, Boermeester MA, Busch OR, Stoker J, Laméris JS, Dijkgraaf MGW, Huibregtse K, Bruno MJ. Endoscopic versus surgical drainage of the pancreatic duct in chronic pancreatitis. *N Engl J Med*. 2007; 356(7): 676–684.
11. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8(9): 729–740.

12. Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(10): 4337–4341.
13. d’Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*. 2003; 426(6963): 194–198.
14. de Leeuw AM, McCarthy SP, Geerts A, Knook DL. Purified rat liver fat-storing cells in culture divide and contain collagen. *Hepatology*. 1984; 4(3): 392–403.
15. Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev*. 1994; 8(21): 2540–2551.
16. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocke M, Campisi J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(20): 9363–9367.
17. Díte P, Ruzicka M, Zboril V, Novotný I. A prospective, randomized trial comparing endoscopic and surgical therapy for chronic pancreatitis. *Endoscopy*. 2003; 35(7): 553–558.
18. Díte P, Stary K, Novotny I, Precechtelová M, Dolina J, Lata J, Zboril V. Incidence of chronic pancreatitis in the Czech Republic. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001; 13(6): 749–750.
19. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993; 75(4): 817–825.
20. Emmrich J, Weber I, Nausch M, Sparmann G, Koch K, Seyfarth M, Löhr M, Liebe S. Immunohistochemical characterization of the pancreatic cellular infiltrate in normal pancreas, chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Digestion*. 1998; 59(3): 192–198.
21. Erkan M, Adler G, Apte MV, Bachem MG, Buchholz M, Detlefsen S, Esposito I, Friess H, Gress TM, Habisch HJ, Hwang RF, Jaster R, Kleeff J, Klöppel G, Kordes C, Logsdon CD, Masamune A, Michalski CW, Oh J, Phillips PA, Pinzani M, Reiser-Erkan C, Tsukamoto H, Wilson J. StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut*. 2012; 61(2): 172–178.
22. Etemad B, Whitcomb DC. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology*. 2001; 120(3): 682–707.

23. Fitzner B, Müller S, Walther M, Fischer M, Engelmann R, Müller-Hilke B, Pützer BM, Kreutzer M, Nizze H, Jaster R. Senescence determines the fate of activated rat pancreatic stellate cells. *J Cell Mol Med*. 2012; 16(11): 2620–2630.
24. Foster JR. A review of animal models of nonneoplastic pancreatic diseases. *Toxicol Pathol*. 2014; 42(1): 243–259.
25. Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y. Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev*. 1994; 8(24): 2939–2952.
26. Haber PS, Keogh GW, Apte MV, Moran CS, Stewart NL, Crawford DHG, Pirola RC, McCaughan GW, Ramm GA, Wilson JS. Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. *Am J Pathol*. 1999; 155(4): 1087–1095.
27. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990; 345(6274): 458–460.
28. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. 1993; 75(4): 805–816.
29. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1965; 37(3): 614–636.
30. Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell*. 2001; 107(1): 67–77.
31. Hense S, Sparmann G, Weber H, Liebe S, Emmrich J. Immunologic characterization of acute pancreatitis in rats induced by dibutyltin dichloride (DBTC). *Pancreas*. 2003; 27(1): e6-e12.
32. Jaster R, Emmrich J. Crucial role of fibrogenesis in pancreatic diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2008; 22(1): 17-29.
33. Jaster R, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S. Extracellular signal regulated kinases are key mediators of mitogenic signals in rat pancreatic stellate cells. *Gut*. 2002; 51(4): 579–584.
34. Jaster R, Sparmann G, Hauenstein K, Nizze H, Liebe S. Autoimmunpankreatitis: Grundlagen - Pathologie - Klinik. *Ärzteblatt Mecklenburg-Vorpommern*. 2012; 22(1): 5–9.
35. Jaster R. Molecular regulation of pancreatic stellate cell function. *Mol Cancer*. 2004; 3: 26.

36. Kennedy RH, Bockman DE, Uscanga L, Choux R, Grimaud JA. Pancreatic extracellular matrix alterations in chronic pancreatitis. *Pancreas*. 1987; 2(1): 61–72.
37. Klonowski-Stumpe H, Fischer R, Reinehr R, Lüthen R, Häussinger D. Apoptosis in activated rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002; 283(3): G819-G826.
38. Klöppel G, Maillet B. Pathology of acute and chronic pancreatitis. *Pancreas*. 1993; 8(6): 659–670.
39. Kordes C, Sawitza I, Götze S, Häussinger D. Stellate Cells from rat pancreas are stem cells and can contribute to liver regeneration. *PLoS ONE*. 2012; 7(12): e51878.
40. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, Yee H, Zender L, Lowe SW. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*. 2008; 134(4): 657–667.
41. Lankisch PG. Natural course of chronic pancreatitis. *Pancreatology*. 2001; 1(1): 3–14.
42. Lankisch PG, Assmus C, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Epidemiology of pancreatic diseases in Lüneburg County. A study in a defined german population. *Pancreatology*. 2002; 2(5): 469–477.
43. Lerch MM, Gorelick FS. Models of acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 2013; 144(6): 1180–1193.
44. Lukas J, Parry D, Aagaard L, Mann DJ, Bartkova J, Strauss M, Peters G, Bartek J. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature*. 1995; 375(6531): 503–506.
45. Manapov F, Muller P, Rychly J. Translocation of p21Cip1/WAF1 from the nucleus to the cytoplasm correlates with pancreatic myofibroblast to fibroblast cell conversion. *Gut*. 2005; 54(6): 814–822.
46. Martens UM, Chavez EA, Poon SSS, Schmoor C, Lansdorp PM. Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Exp Cell Res*. 2000; 256(1): 291–299.
47. Mato E, Lucas M, Petriz J, Gomis R, Novials A. Identification of a pancreatic stellate cell population with properties of progenitor cells: new role for stellate cells in the pancreas. *Biochem J*. 2009; 421(2): 181–191.
48. Merkord J. Untersuchungen über toxische Wirkungen von Dibutylzinndichlorid (DBTC) auf Gallengang, Pankreas und Leber der Ratte und die Entwicklung eines tier-

- experimentellen Modells für die Pankreatitis. Habilitationsschrift; 2002; Universität Rostock.
49. Merkord J, Henninghausen G. Acute pancreatitis and bile duct lesions in rat induced by dibutyltin dichloride. *Exp Pathol.* 1989; 36(1): 59–62.
 50. Merkord J, Jonas L, Weber H, Kröning G, Nizze H, Henninghausen G. Acute interstitial pancreatitis in rats induced by dibutyltin dichloride (DBTC): pathogenesis and natural course of lesions. *Pancreas.* 1997; 15(4): 392–401.
 51. Merkord J, Weber H, Sparmann G, Jonas L, Henninghausen G. The course of pancreatic fibrosis induced by dibutyltin dichloride (DBTC). *Annals NY Acad Sci.* 1999; 880(1): 231–237.
 52. Mews P, Phillips P, Fahmy R, Korsten M, Pirola R, Wilson J, Apte M. Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis. *Gut.* 2002; 50(4): 535–541.
 53. Moiseeva O, Mallette FA, Mukhopadhyay UK, Moores A, Ferbeyre G. DNA damage signaling and p53-dependent senescence after prolonged beta-interferon stimulation. *Mol Biol Cell.* 2006; 17(4): 1583–1592.
 54. Müller S. Mechanismen der Seneszenz pankreatischer Sternzellen. Diplomarbeit; 2010; Universität Rostock.
 55. Munro J, Barr NI, Ireland H, Morrison V, Parkinson EK. Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-like state in human cells by a p16-dependent mechanism that is independent of a mitotic clock. *Exp Cell Res.* 2004; 295(2): 525–538.
 56. Nair RJ, Lawler L, Miller MR. Chronic pancreatitis. *Am Fam Physician.* 2007; 76(11): 1679–1688.
 57. Narita M, Nuñez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell.* 2003; 113(6): 703–716.
 58. Nelson WG, Kastan MB. DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol.* 1994; 14(3): 1815–1823.
 59. Newbold RF, Overell RW. Fibroblast immortality is a prerequisite for transformation by EJ c-Ha-ras oncogene. *Nature.* 1983; 304(5927): 648–651.

60. Ogryzko VV, Hirai TH, Russanova VR, Barbie DA, Howard BH. Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Mol Cell Biol.* 1996; 16(9): 5210–5218.
61. Packer L, Fuehr K. Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature.* 1977; 267(5610): 423–425.
62. Parrinello S, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, Campisi J. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol.* 2003; 5(8): 741–747.
63. Ramirez RD, Morales CP, Herbert BS, Rhode JM, Passons C, Shay JW, Wright WE. Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev.* 2001; 15(4): 398–403.
64. Reinehr R, Zoller S, Klonowski-Stumpe H, Kordes C, Häussinger D. Effects of angiotensin II on rat pancreatic stellate cells. *Pancreas.* 2004; 28(2): 129–137.
65. Rieckeheer KL. Ätiologie der chronischen Pankreatitis – Ein immunologischer Ansatz. Dissertationsschrift; 2012; Universität Rostock.
66. Riemann JF, Fischbach W, Galle PR, Mössner J. Gastroenterologie. Sammelband; 2010; Stuttgart NY: Thieme.
67. Sah RP, Chari ST, Pannala R, Sugumar A, Clain JE, Levy MJ, Pearson RK, Smyrk TC, Petersen BT, Topazian MD, Takahashi N, Farnell MB, Vege SS. Differences in clinical profile and relapse rate of type 1 versus type 2 autoimmune pancreatitis. *Gastroenterology.* 2010; 139(1): 140–148.
68. Sarles H, Bernard JP, Johnson C. Pathogenesis and epidemiology of chronic pancreatitis. *Annu Rev Med.* 1989; 40(1): 453–468.
69. Schneider A. and Whitcomb D. C. Hereditary pancreatitis: a model for inflammatory diseases of the pancreas. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2002; 16(3): 347–363.
70. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182(3): 311–322.
71. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* 1997; 88(5): 593–602.
72. Skalli O, Pelte MF, Peclet MC, Gabbiani G, Gugliotta P, Bussolati G, Ravazzola M, Orci L. Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is

- present in microfilamentous bundles of pericytes. *J Histochem Cytochem.* 1989; 37(3): 315–321.
73. Slater SD, Williamson RCN, Foster CS. Expression of transforming growth factor- β_1 in chronic pancreatitis. *Digestion.* 1995; 56(3): 237–241.
 74. Slebos RJC, Lee MH, Plunkett BS, Kessis TD, Williams BO, Jacks T, Hedrick L, Kastan MB, Cho KR. p53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(12): 5320–5324.
 75. Sparmann G, Merkord J, Jäschke A, Nizze H, Jonas L, Löhr M, Liebe S, Emmrich J. Pancreatic fibrosis in experimental pancreatitis induced by dibutyltin dichloride. *Gastroenterology.* 1997; 112(5): 1664-1672.
 76. Sparmann G, Glass Ä, Brock P, Jaster R, Koczan D, Thiesen HJ, Liebe S, Emmrich J. Inhibition of lymphocyte apoptosis by pancreatic stellate cells: impact of interleukin-15. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005; 289(5): G842-G851.
 77. Sparmann G, Behrend S, Merkord J, Kleine HD, Graser E, Ritter T, Liebe S, Emmrich J. Cytokine mRNA levels and lymphocyte infiltration in pancreatic tissue during experimental chronic pancreatitis induced by dibutyltin dichloride. *Dig Dis Sci.* 2001; 46(8): 1647–1656.
 78. Sparmann G, Kruse ML, Hofmeister-Mielke N, Koczan D, Jaster R, Liebe S, Wolff D, Emmrich J. Bone marrow-derived pancreatic stellate cells in rats. *Cell Res.* 2010; 20(3): 288–298.
 79. Stein GH, Duli V. Origins of G1 arrest in senescent human fibroblasts. *Bioessays.* 1995; 17(6): 537–543.
 80. Stevens T, Conwell DL, Zuccaro G. Pathogenesis of chronic pancreatitis: an evidence-based review of past theories and recent developments. *Am J Gastroenterol.* 2004; 99(11): 2256–2270.
 81. Tremain R, Marko M, Kinnimulki V, Ueno H, Bottinger E, Glick A. Defects in TGF β signaling overcome senescence of mouse keratinocytes expressing v-rasHa. *Oncogene.* 2000; 19(13): 1698–1709.
 82. Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, Lu X, Soron G, Cooper B, Brayton C, Park SH, Thompson T, Karsenty G, Bradley A, Donehower LA. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature.* 2002; 415(6867): 45–53.

83. van Laethem JL, Deviere J, Resibois A, Rickaert F, Vertongen P, Ohtani H, Cremer M, Miyazono K, Robberecht P. Localization of transforming growth factor β 1 and its latent binding protein in human chronic pancreatitis. *Gastroenterology*. 1995; 108(6): 1873–1881.
84. Watanabe T, Masamune A, Kikuta K, Hirota M, Kume K, Satoh K, Shimosegawa T. Bone marrow contributes to the population of pancreatic stellate cells in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009; 297(6): G1138-G1146.
85. Williams GC. Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution*. 1957; 11(4): 398–411.
86. Zhang H, Cohen SN. Smurf2 up-regulation activates telomere-dependent senescence. *Genes Dev*. 2004; 18(24): 3028–3040.

9 Anhang

9.1 Herstellerverzeichnis

Hersteller	Firmensitz
BD Pharmingen	Heidelberg, Deutschland
Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Biotest Pharma	Dreieich, Deutschland
BMA Biomedicals	Augst, Schweiz
Charles River Laboratories	Sulzfeld, Deutschland
Dako	Glostrup, Dänemark
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Fröbel Labortechnik GmbH	Lindau, Deutschland
Gibco Life Technologies	Carlsbad CA, USA
Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Heraeus	Hanau, Deutschland
Hettich Lab Technology	Tuttlingen, Deutschland
Immunotools	Friesoythe, Deutschland
Invitrogen Life Technologies	Carlsbad CA, USA
Leica Biosystems	Wetzlar, Deutschland
Marienfeld GmbH	Lauda-Königshofen, Deutschland
Medite	Burgdorf, Deutschland
Merck Chemicals GmbH	Schwalbach, Deutschland
New England BioLabs	Frankfurt, Deutschland
PAA Laboratories GmbH	Cölbe, Deutschland
Roche	Mannheim, Deutschland
Roth Chemie GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Sakura	Staufen, Deutschland
Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland
Thermo Scientific	Waltham MA, USA
Zeiss	Oberkochen, Deutschland

9.2 Danksagung

Mein Dank gilt insbesondere Herrn Prof. Dr. med. Robert Jaster für die Vergabe des Themas, die stetige Unterstützung und Beratung sowohl im praktischen als auch im schriftlichen Bereich dieser Arbeit und die jederzeit sehr konstruktive Zusammenarbeit. Dafür gilt Ihm mein größter Respekt.

Auch der Arbeitsgruppe des gastroenterologischen Forschungslabors möchte ich einen großen Dank für die Zuarbeit sowie die vielen Erklärungen und Hinweise aussprechen, die zum Erlernen und erfolgreichen Durchführen der nötigen Arbeiten sehr hilfreich waren. Besonders hervorzuheben sind dabei Frau Dr. rer. nat. Brit Fitzner, Frau Katja Bergmann, Frau Dipl.-Biol. Sarah Müller und Herr Dr. rer. nat. Falko Lange.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Horst Nizze vom Institut für Pathologie für die Zuarbeit der HE-Färbungen und deren Auswertung danken.

Meine Familie, Freunde und viele weitere namentlich nicht genannte Personen haben Anteil am Erfolg dieser Arbeit durch Unterstützung auf ganz unterschiedliche Weise. Auch Ihnen gilt mein Dank. Dabei möchte ich das unermüdliche Engagement meiner Ehefrau besonders hervorheben.

Meinem Gott, dem Schöpfer und Erhalter des Lebens, möchte ich danken für die wunderbare Führung, welche er mir während der letzten Jahre zuteilwerden ließ. Ihm, der mir täglich neue Kraft gibt, sei Ehre und Dank.

„Denn der Herr gibt Weisheit, aus seinem Mund kommen Erkenntnis und Einsicht.“
Sprüche 2,6 (Bibel - Schlachter 2000)

9.3 Veröffentlichungen

Abstracts

Fitzner B, Müller S, Walther M, Jaster R. Mechanismen der Seneszenz pankreatischer Sternzellen. 66. Jahrestagung der DGVS, Leipzig, 14. - 17.10.2011. Abstract: Zeitschrift für Gastroenterologie. 2011; 49(8): P356.

Fitzner B, Müller S, Walther M, Nizze H, Jaster R. Senescence limits the profibrogenic activity of rat pancreatic stellate cells. 44th Meeting of the European Pancreatic Club, Prague, 20. - 23.6.2012. Abstract: Pancreatology. 2012; 12(6): 506.

Fitzner B, Müller S, Walther M, Lange A, Nizze H, Jaster R. Senescence of rat pancreatic stellate cells is mediated by CDKN1A and contributes to termination of wound healing. Annual Meeting of the American Pancreatic Association, Miami, 31.10. - 03.11.2012. Abstract: Pancreas. 2012; 41(8): 1358.

Publikation

Fitzner B, Müller S, Walther M, Fischer M, Engelmann R, Müller-Hilke B, Pützer BM, Kreutzer M, Nizze H, Jaster R. Senescence determines the fate of activated rat pancreatic stellate cells. J Cell Mol Med. 2012; 16(11): 2620-2630